PEVIVA

CE

M65® ELISA

REF 10020

Instructions for Use

Bruksanvisning

Gebrauchsanweisung

Mode d’emploi

Istruzioni per l’uso

Instrucciones de uso

In USA, Canada and Japan
For research and laboratory use only.
Not for human or diagnostic use.

M65® ELISA

Instructions for Use	English:	page 5 – 15	En
Bruksanvisning	Svenska:	sida 17 – 27	Sv
Gebrauchsanweisung	Deutsch:	Seite 29 – 39	De
Mode d'emploi	Français:	pages 41 – 51	Fr
Istruzioni per l'uso	Italiano:	pagina 53 – 63	It
Instrucciones de uso	Español:	página 65 – 75	Es

Instructions for Use of the M65® ELISA

En

Contents

- Explanation of Symbols Used on Labels 6
- Trademarks 6
- Shipping and Storage 6

Assay Description 7
- Intended Purpose 7
- Summary and Explanation of the Test 7
- Principle of the Method 7
- Materials Provided for 96 Determinations 8
- Materials Required but not Provided 9

Assay Protocol 9
- Warnings and Precautions 9
- Collection and Preparation of Blood Samples 9
- Collection and Preparation of *in vitro* Samples for Research Use Only 10
- Component Preparation 10
- Storage and Shelf Life After First Opening 11
- Assay Procedure 12
- Flow Chart 13
- Calculation of Analytical Results 13

Assay Performance 14
- Performance Characteristics 14
- Traceability of Standard 14
- Internal Quality Control 14
- Limitations of the Method 15
- Literature References 15
- Warranty 15

Explanation of Symbols Used on Labels

	Catalogue number
	Contains sufficient for <n> tests
	Batch code
	Manufacturer
	Temperature limitation
	Use by
	Consult Instructions for Use

Trademarks

M30®, Apoptosense®, M65®, EpiDeath® and PEVIVA® are registered trademarks of VLVbio (Vivalavida AB).

Shipping and Storage

The M65® ELISA is shipped in cooled conditions and should be stored at 2 – 8 °C. ***Note!*** Do not freeze!

Assay Description

Intended Purpose

The M65® ELISA is a one-step *in vitro* immunoassay for the quantitative determination of soluble keratin 18 (K18) in serum and plasma.

Summary and Explanation of the Test

Extracellular K18 can be used as a marker for epithelial cell death. During necrosis, loss of cell membrane integrity will result in the release of intracellular proteins, including K18, into the extracellular compartment. Apoptosis represents an active form of cell death that initially preserves plasma membrane integrity but which is commonly followed by secondary necrosis where intracellular components are released. The M65® ELISA assay measures total soluble K18 released from dead cells (necrotic and apoptotic). Measurements from cell culture supernatants or human serum/plasma samples by the M65® ELISA will therefore represent the total epithelial cell death by any cause (ref. 1).

K18 is cleaved by caspases during apoptosis. The M30 Apoptosense® ELISA assay (PEVIVA prod. no. 10011; ref. 2) specifically measures the level of caspase-cleaved K18 fragments (ccK18) containing the K18Asp396 neo-epitope. The combination of the M30 Apoptosense® ELISA and the M65® ELISA therefore facilitates the determination of cell death mode *in vitro* and in serum or plasma from patients or experimental animals with human tumour xenografts (ref. 1, 3, 4).

The M65® ELISA uses two mouse monoclonal antibodies (clone M5, IgG2b, and M6, IgG2a) specific for conventional epitopes of K18. The M5 antibody detects human K18, but does not react to mouse K18 (ref. 4). The M65® ELISA will specifically detect tumour cell death in mice carrying human tumour xenografts (ref. 4).

M65® ELISA is used for research and clinical trials in the fields of oncology, hepatology, transplantation and sepsis.

Principle of the Method

The M65® ELISA is a solid-phase sandwich enzyme immunoassay. Standards, controls and samples react with a solid phase capture antibody M6 directed against K18 and the HRP (horseradish peroxidase) conjugated M5 antibody directed against a different epitope of K18. Unbound conjugate is removed by a washing step. TMB substrate is added. The colour

development is stopped and the absorbance is read. The resulting colour is directly proportional to the concentration of the analyte.

By plotting a standard curve from known concentrations versus measured absorbance, the amount of antigen in the sample can be calculated. The concentration of the antigen is expressed as units per litre (U/L).

Materials Provided for 96 Determinations

M6 Coated Microstrips: One microplate, 12 strips with 8 wells each, 96 dry wells in total. The wells are coated with mouse monoclonal K18 antibody M6. The microplate is sealed in an aluminium bag, which contains a desiccating device. If not all the strips are used, reseal the bag and keep the desiccating device inside. ***Ready for use!***

M65 HRP Conjugate: Concentrate (24 × conc). One vial containing 0.4 mL of mouse monoclonal M5 antibody (anti-K18) conjugated with horseradish peroxidase (HRP) in a phosphate buffer with protein stabilizers. Preservative added. Should be diluted with M65 Conjugate Dilution Buffer. ***Note!*** Do not expose to light!

M65 Conjugate Dilution Buffer: One vial containing 11 mL of phosphate buffer with protein stabilizers for dilution of the M65 HRP Conjugate. Preservative added. Blue coloured. ***Ready for use!***

M65 Standard A – G: Standard A containing 2 mL of phosphate buffer with foetal calf serum (FCS). Standard B – G, 0.5 mL each, containing standard material in phosphate buffer with FCS. The values of Standard A – G are 0, 125, 250, 500, 750, 1 200 and 2 000 U/L, respectively. Preservative added. Yellow coloured. ***Ready for use!*** Serum/plasma samples > 2 000 U/L can be diluted 1 + 1 with Standard A, but dilution with pooled human serum is recommended (see section “Performance Characteristics”).

M65 Control Low & High: Two vials containing 0.5 mL of reactive components in phosphate buffer with FCS. The values of M65 Control Low and High are stated on the respective vials. Preservative added. Yellow coloured. ***Ready for use!***

Wash Tablet: One tablet for 500 mL of prepared wash solution. Dissolve the Wash Tablet in 500 mL of fresh deionised water.

TMB Substrate: One bottle containing 22 mL of TMB (3,3′,5,5′-Tetramethylbenzidine) Solution. ***Note!*** Do not expose to light! ***Ready for use!***

Stop Solution: One vial containing 7 mL of 1.0 M sulphuric acid. ***Ready for use!***

Sealing Tape: One (1) sheet.

Instructions for Use.

Certificate of Analysis.

Materials Required but not Provided

- Microplate reader (wavelength: 450 nm; linear 0 – 3 OD)
- Microplate shaker (oscillation: 600 rpm; orbit: 1.5 – 4 mm)
- 96-well microtiter plate washer or multichannel pipette (volume 250 µL)
- Vortex mixer
- Precision pipettes: 25, 50, 75 and 200 µL
- Cylinder (500 mL)
- Deionised water

Assay Protocol

Warnings and Precautions

1. The M65® ELISA kit is intended for *in vitro* use only.
2. Do not mix reagents from different kit lots.
3. All patient specimens should be regarded as contagious and handled and disposed of according to appropriate regulations.
4. Do not use samples that are contaminated.
5. The Stop Solution contains 1.0 M sulphuric acid, which will cause irritation of the skin and is harmful to the eyes. In case of contact, flush with plenty of water and seek medical advice.
6. Material Safety Data Sheets (MSDS) are available on www.peviva.com or by request.

Collection and Preparation of Blood Samples

The sample volume should be sufficient for measuring each sample in duplicate (test volume 2 × 25 µL). Donors do not need to be fasting prior to blood collection.

Serum: Collect blood by venipuncture, avoiding haemolysis, into plain tubes (without anti-coagulant), allow blood to clot and collect serum after centrifugation.

Plasma: The M65® ELISA can also be used for plasma samples (EDTA, heparin or citrate).

Note! The same type of material, i.e. serum or plasma collected by one method, should be used for a specific project. For further information on the performance of the M65® ELISA using different types of samples, please consult www.peviva.com.

Store samples at 2 – 8 °C up to 4 hours. For longer periods, store samples frozen at - 20 °C or lower. Samples can be freeze-thawed without loss of

activity (ref. 3, 5), but it is recommended that repeated freeze-thawing should be avoided. For dilution of samples see section “Performance Characteristics”.

Collection and Preparation of *in vitro* Samples for Research Use Only

The M65® ELISA can be used to assess total cell death of epithelial cells *in vitro* by measuring release of K18 protein into the culture medium. The M30 Apoptosense® ELISA and the M65® ELISA can be used to assess cell death mode by calculation of an M30:M65 ratio (ref. 1, 6). The ratio should be calibrated for each carcinoma cell line using appropriate controls; i.e. agents known to induce apoptosis (e.g. genotoxic agents or staurosporine) and/or mainly necrosis (e.g. oligomycin treatment of glucose starved cells or treatment with hydrogen peroxide) (ref. 1).

Day 1: Seed the cells. The seeding density needs to be determined for the specific cell type and the type of cytotoxic agent; 5 000 – 10 000 cells per well in a 96-well plate is usually adequate.

Day 2: Wash the cells once with PBS and add fresh medium (200 µL/well). Expose the cells to the desired agent(s).

Day 2 – 4: Collect the sample medium from each well. To avoid drying effects, collecting multiple samples from the same well is not recommended. Centrifuge the medium and collect the cell-free supernatant. ***Note!*** Avoid collecting cells. 2 × 25 µL of cell-free supernatant samples are used for each assay.

If the assay is to be performed the same day, the samples can be stored at 2 – 8 °C. Samples to be analysed later should be stored at - 20 °C or lower. Avoid repeated freeze-thawing.

Component Preparation

Dilution of M65 HRP Conjugate

Dilute the M65 HRP Conjugate with M65 Conjugate Dilution Buffer. The M65 HRP Conjugate vial contains exactly 0.4 mL. Add 9.2 mL of M65 Conjugate Dilution Buffer directly to the M65 HRP Conjugate vial and mix.

Dissolving of Wash Tablet

Dissolve one Wash Tablet in 500 mL of fresh deionised water.

En

Storage and Shelf Life After First Opening

If the entire kit is not used, store reagents in their original containers at 2 – 8 °C. If not all strips are used, reseal the microstrips bag. Remember to include the desiccating device.

The TMB Substrate and the M65 HRP Conjugate are sensitive to light and metal ions and should be stored in the original amber bottles at 2 – 8 °C at all times between uses. If a new container is used it has to be protected from light! TMB Substrate cannot be used after exposure to light.

If the kit is used on several occasions, store the diluted M65 HRP Conjugate in the vial at 2 – 8 °C. Do not expose to light. The diluted M65 HRP Conjugate solution is stable for 3 weeks.

The Wash Tablet solution is stable for 5 weeks when stored at 2 – 8 °C.

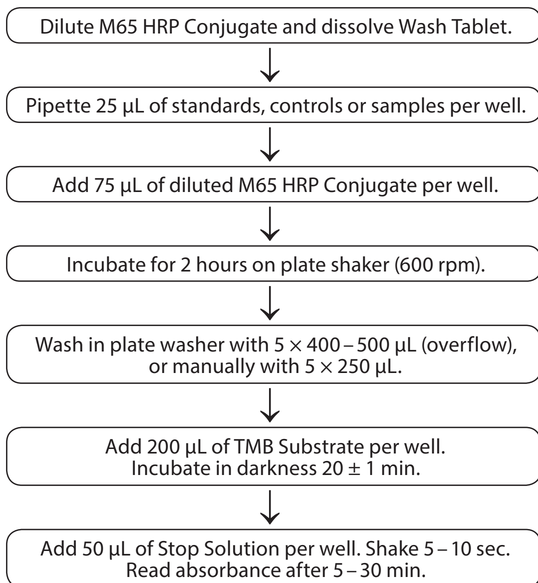
Assay Procedure

The M65® ELISA should be performed at room temperature (24 ± 3 °C).

1. Allow all reagents to reach room temperature before performing the assay. Vortex all reagents prior to use.
2. Dissolve the Wash Tablet in fresh deionised water (see "Component Preparation").
3. Dilute the M65 HRP Conjugate with M65 Conjugate Dilution Buffer (see "Component Preparation") and mix.
4. Pipette 25 µL of M65 Standard (A – G), M65 Control Low, M65 Control High or sample per well (duplicates are recommended).
5. Add 75 µL of the diluted M65 HRP Conjugate solution to each well. ***Note!*** *Steps 4 and 5 should be performed sequentially without interruption within 20 minutes.*
6. Cover the wells with sealing tape or a microtiter plate lid.
7. Incubate on shaker for 2 hours. Speed setting: 600 rpm.
8. Wash the plate in a plate washer 5 times with 400 – 500 µL of Wash Tablet solution per well (overflow wash)
   or
   Wash the plate manually, discarding the incubation solution and washing the wells 5 times with 250 µL of Wash Tablet solution . Avoid contamination between wells.
9. Add 200 µL of TMB Substrate to each well. Incubate in darkness at room temperature for 20 ± 1 minutes.
10. Add 50 µL of Stop Solution to each well. To ensure complete mixing of the TMB Substrate and the Stop Solution, shake the microplate for 5 – 10 seconds. Leave the microplate for 5 minutes before reading the absorbance.
11. Determine the absorbance at 450 nm in a microplate reader within 30 minutes and record the results.
12. Calculate the results as described in section "Calculation of Analytical Results".

En

Flow Chart



Calculation of Analytical Results

The M65® ELISA results are calculated using computer-assisted methods. Evaluate the values of controls and samples using a suitable program for handling ELISA-type data. Fitting algorithm: Cubic Spline. x-axis: concentration (U/L); y-axis: absorbance at 450 nm (A450).

Note! If samples have been diluted, the observed concentration must be multiplied by the dilution factor, and in case blood donor serum/ plasma was used as sample diluent, its M65 concentration (U/L) must be accounted for.

Assay Performance

Performance Characteristics

Measuring range: The measuring range is 0 – 2 000 U/L.

High Dose Effect: No High Dose effect occurs up to 50 000 U/L.

Reproducibility: Within assay (WA % CV) variation is < 10 % and between assay (BA % CV) variation is < 10 % for samples > 200 U/L.

Sensitivity: The minimum detectable concentration of K18 in M65® ELISA is 11 U/L, defined as the concentration of K18 that corresponds to the absorbance being two standard deviations from the absorbance of the Standard A (0 U/L).

Spiking Recovery: The Standard provided with the kit contains recombinant material that behaves differently from the K18 protein in blood samples and is therefore not considered adequate for spiking recovery tests.

Linearity/Dilution: Recovery of human sera when diluted in M65 Standard A (0 U/L): 126 % (average) and 116 – 139 % (range). Recovery of human sera when diluted in blood donor serum: 120 % (average) and 101 – 133 % (range). Serum/plasma samples > 2 000 U/L can be diluted 1 + 1 with Standard A, but dilution with pooled human serum is recommended.

Reference range: In serum from 222 Swedish blood donors, the median was 264 U/L and the 95th percentile was 413 U/L. It is recommended that each laboratory establish its own reference range.

Traceability of Standard

The units measured by the M65® ELISA are defined against a synthetic peptide containing the M6 and M5 epitopes. 1 U/L = 1.24 pM (ref. 1).

Internal Quality Control

The supplied M65 Control Low and High with their given concentrations should be sufficient to secure the assay performance and should be used, at least, in duplicate each time the assay is performed.

If this procedure is not sufficient, each laboratory needs to establish its own controls by the guidelines in section "Collection and Preparation of *in vitro* Samples for Research Use Only" or by individual laboratory routine. These controls should be frozen in aliquots and treated in the same way each time the assay is performed.

Limitations of the Method

The clinical utility of K18 measurement in human blood samples as a prognostic indicator and in the management of patients on therapy regimens has not been fully established.

Grossly lipemic (≤ 1 250 mg/dL), icteric (≤ 12.5 mg/dL) or haemolysed (≤ 100 mg/dL) samples do not interfere in the assay.

Literature References

1. Kramer *et al.*, Cancer Res 64, 2004, 1751.
2. Hägg *et al.*, Invest New Drugs 20, 2002, 253.
3. Olofsson *et al.*, Clin Cancer Res 13, 2007, 3198.
4. Olofsson *et al.*, Cancer Biomarkers 5, 2009, 117.
5. Greystoke *et al.*, Ann Oncol 19, 2008, 990.
6. Linder *et al.*, Expert Rev Mol Diagn 10, 2010, 353.

For further references, please consult www.peviva.com/literature.

Warranty

The performance data presented here were obtained using the procedure indicated. Any change or modification in this procedure as recommended by the manufacturer may affect the results. In such event, the manufacturer disclaims all warranties expressed, implied or statutory, including the implied warranty of merchantability and the fitness for use. The manufacturer and its authorized distributors, in such event, shall not be liable for damages indirect or consequential.

Bruksanvisning för M65® ELISA

Sv

Innehållsförteckning

- Förklaring av symbolerna som används på etiketterna 18
- Varumärken 18
- Leverans och förvaring 18

Beskrivning av testet 19

- Avsedd användning 19
- Sammanfattning och metodens princip 19
- Testprincip 19
- Material för 96 bestämningar 20
- Material som krävs men inte tillhandahålls 21

Testförfarande 21

- Varningar och försiktighetsåtgärder 21
- Provtagning och hantering av blodprover 21
- Provtagning och hantering av prover för utvecklingsändamål 22
- Spädning av komponenter 23
- Förvaring av komponenter efter första öppnandet 23
- Testprocedur 24
- Flödesschema 25
- Beräkning av resultat 25

Mätmetodens prestanda 26

- Metodens karaktäristik 26
- Kalibrering 26
- Intern kvalitetskontroll 26
- Metodens begränsningar 27
- Litteratur och referenser 27
- Garanti 27

Förklaring av symbolerna som används på etiketterna

	Katalognummer
	Räcker till ”n” antal tester
	Lot nummer
	Tillverkare
	Temperaturbegränsning
	Använd före
	Se handhavandebeskrivningen

Varumärken

M30®, Apoptosense®, M65®, EpiDeath® och PEVIVA® är varumärken registrerade av VLVbio (Vivalavida AB).

Leverans och förvaring

M65® ELISA skickas kyld och ska förvaras i 2 – 8 °C. ***Obs!*** Får ej frysas!

Beskrivning av testet

Avsedd användning

M65® ELISA är ett *in vitro*-enstegsimmunotest för kvantitativ bestämning av lösligt keratin 18 (K18) i serum och plasma.

Sammanfattning och metodens princip

Extracellulärt K18 kan användas som en markör för att mäta epitelial celldöd. Under nekros kommer disintegration av cellens plasmamembran att leda till att intracellulära proteiner, inklusive K18, frisätts från cellen. Apoptos är en aktiv form av celldöd där plasmamembranet initialt är intakt. Därefter sker vanligtvis s.k. sekundär nekros där intracellulära proteiner frisätts. M65® ELISA mäter totalt lösligt K18 som frisätts från döda celler (nekrotiska och apoptotiska). Mätningar av prover från vävnadsodlingsmedium eller mänskligt serum/plasma med M65® ELISA kommer därför att spegla epitelial celldöd, oberoende av mekanism (ref. 1).

K18 klyvs av kaspaser under apoptos. M30 Apoptosense® ELISA (PEVIVA prod.-nr 10011; ref. 2) mäter specifikt nivåerna av caspasklyvda K18-fragment (ccK18) innehållande neo-epitopen K18Asp396. Kombinationen av M65® ELISA och M30 Apoptosense® ELISA innebär en unik möjlighet för både kvalitativ (nekros eller apoptos) och kvantitativ bestämning av celldöd. Vävnadsodlingsmedium och serum/plasma från patienter eller från försöksdjur med mänskliga xenografttumörer kan användas för sådana mätningar (ref. 1, 3, 4).

M65® ELISA baseras på två monoklonala musantikroppar (klon M5, typ IgG2b, och M6, typ IgG2a), som är specifika för olika epitoper på K18. M5-antikroppen binder till humant K18, men reagerar inte med K18 från möss (ref. 4). Därför ger M65® ELISA ett värde som är specifikt för tumör-apoptosen i möss som bär mänskliga xenografttumörer (ref. 5).

M65® ELISA används för forskning och kliniska studier inom områdena onkologi, hepatologi, transplantation och sepsis.

Testprincip

M65® ELISA är en fastfas-”sandwich”-enzymimmunotest. Standarder, kontroller och prover reagerar med fastfas-”capture”-antikroppen M6 och HRP- (pepparrotsperoxidas) konjugerad M5-antikropp, som är riktade mot två olika epitoper på K18. Obunden konjugerad antikropp

avlägsnas genom upprepade tvättar. TMB-substrat tillsätts. Färgreaktionen stoppas och absorbans läses av. Färgintensiteten är direkt proportionell mot analytens koncentration.

Genom att konstruera en standardkurva med kända koncentrationer mot uppmätt absorbans kan mängden antigen i provet avläsas. Antigenkoncentration anges i enheter per liter (U/l).

Material för 96 bestämningar

M6 Coated Microstrips: En platta innehållande 96 torra brunnar (12 strips × 8 brunnar). Brunnarna är belagda med monoklonal musantikropp M6 (anti-K18). Mikrotiterplattan är packad i en aluminiumpåse innehållande torkmedel. Återförslut aluminiumpåsen inklusive torkmedel om inte alla strips används direkt. ***Färdig för användning!***

M65 HRP Conjugate: Koncentrat (24 × konc.). En flaska innehållande 0,4 ml monoklonal M5-musantikropp (anti-K18) konjugerad med pepparrotsperoxidas (HRP) i fosfatbuffert med proteinstabilisatorer. Ska spädas med M65 Conjugate Dilution Buffer. Konserveringsmedel tillsatt. ***Obs!*** *Undvik exponering för ljus!*

M65 Conjugate Dilution Buffer: En flaska innehållande 11 ml fosfatbuffert med proteinstabilisatorer för spädning av M65 HRP Conjugate. Konserveringsmedel tillsatt. Blåfärgad. ***Färdig för användning!***

M65 Standard A – G: Standard A innehållande 2 ml fosfatbuffert med fetalkalvserum. Standard B – G innehållande vardera 0,5 ml standardmaterial i fosfatbuffert med fetalkalvserum. Koncentrationerna för standarderna A – G är 0, 125, 250, 500, 750, 1 200 och 2 000 U/l. Konserveringsmedel tillsatt. Gulfärgad. ***Färdig för användning!*** Prover > 2 000 U/l kan spädas 1 + 1 med Standard A, men spädning med poolat humanserum rekommenderas (se ”Metodens karaktäristik”).

M65 Control Low & High: Två flaskor, 0,5 ml vardera, med reaktiva komponenter i fosfatbuffert med fetalkalvserum. Koncentration för M65 Control Low och High anges på respektive flasketikett. Konserveringsmedel tillsatt. Gulfärgad. ***Färdig för användning!***

Wash Tablet: En tablett för 500 ml spädd tvättlösning. Lös upp tabletten i 500 ml färskt avjoniserat vatten.

TMB Substrate: En flaska innehållande 22 ml TMB-lösning (3,3′,5,5′-tetrametylbenzidin). ***Obs!*** Undvik exponering för ljus! ***Färdig för användning!***

Stop Solution: En flaska innehållande 7 ml 1,0 M svavelsyra. ***Färdig för användning!***

Sealing Tape: Ett (1) ark.

Bruksanvisning.

Analyscertifikat.

Material som krävs men inte tillhandahålls

Sv

- Mikrotiterplattläsare (våglängd 450 nm, linjär 0 – 3 OD)
- Plattskak för mikrotiterplattor (rotationshastighet: 600 varv/min, amplitud: 1,5 – 4 mm)
- Plattvätt för 96-brunnsplattor eller flerkanalspipett (volym: 250 µl)
- Vortex
- Pipetter för 25; 50; 75 och 200 µl
- Mätglas (500 ml)
- Avjonsierat vatten

Testförfarande

Varningar och försiktighetsåtgärder

1. M65® ELISA är endast avsedd för *in vitro*-användning.
2. Blanda inte komponenter med olika satsnummer.
3. Patientprover skall hanteras som om de vore smittbärande och skall hanteras enligt gällande bestämmelser.
4. Använd inte kontaminerade prover.
5. Stop Solution innehåller 1,0 M svavelsyra som kan orsaka hudirritationer och är skadlig för ögonen. Tvätta med stora mängder vatten efter exponering och kontakta läkare.
6. Säkerhetsdatablad (MSDS) är tillgängliga på www.peviva.com eller vid förfrågan.

Provtagning och hantering av blodprover

Provvolymen bör vara tillräcklig för att analysera varje prov i duplikat (testvolym 2 × 25 µl). Patienten behöver inte vara fastande före provtagning.

Serum: Blod samlas genom venpunktion i vakuumrör (utan antikoagulant). Undvik hemolys. Låt blodet koagulera. Centrifugera och separera serum från celler/koagel.

Plasma: M65® ELISA kan även användas för plasmaprover (rör som innehåller EDTA, heparin eller citrat).

OBS! Samma typ av provmaterial bör användas under ett specifikt projekt, d.v.s. serum eller plasma insamlat med samma metod. Konsultera www.peviva.com för ytterligare information angående användning av olika typer av prover.

Förvara prover vid 2 – 8 °C upp till 4 timmar. För längre tid förvara prover vid -20 °C eller lägre. Prover kan frystinas utan att de förlorar aktivitet men upprepade frystiningar bör undvikas.

För spädning av prover se stycket ”Metodens karaktäristik”.

Provtagning och hantering av prover för utvecklingsändamål

M65® ELISA kan användas för att fastställa den totala celldöden *in vitro* genom att mäta koncentrationen av lösligt K18 i cellkulturmedium. M30 Apoptosense® ELISA och M65® ELISA kan användas för att fastställa typ av celldöd genom beräkning av kvoten mellan M30 och M65 (ref. 1). Kvoten bör kalibreras för varje carcinomcellinje med hjälp av lämpliga kontroller, t.ex. kända ämnen som orsakar apoptos (t.ex. genotoxiska ämnen eller staurosporin) och/eller huvudsakligen nekros (t.ex. oligomycin-behandling efter glukossvält eller väteperoxid).

Dag 1: Så ut cellerna. Celltätheten måste bestämmas för varje celltyp och cytotoxiskt ämne; 5 000 till 10 000 celler per brunn i en 96-brunnsplatta är normalt tillräckligt.

Dag 2: Tvätta cellerna en gång med PBS och tillsätt färskt medium (200 µl/brunn). Behandla cellerna med önskade ämnen.

Dag 2 – 4: Sug upp ett prov från varje brunn. För att undvika uttorkning av brunnar rekommenderas att flera prover inte tas ur samma brunn. Centrifugera mediet och samla upp den vätska som inte innehåller celler. ***OBS!*** Undvik att få med celler. Använd 2 × 25 µl av denna vätska vid varje test.

Förvara prover vid 2 – 8 °C om testet utförs under samma dag. Förvara prover som ska analyseras vid ett senare tillfälle vid -20 °C eller lägre. Undvik upprepade frystiningar.

Spädning av komponenter

Spädning av M65 HRP Conjugate

Späd M65 HRP Conjugate med M65 Conjugate Dilution Buffer. Flaskan med M65 HRP Conjugate innehåller exakt 0,4 ml konjugerad antikroppslösning. Tillsätt 9,2 ml M65 Conjugate Dilution Buffer direkt till flaskan med M65 HRP Conjugate och blanda.

Spädning av Wash Tablet

Lös upp Wash Tablet i 500 ml färskt avjoniserat vatten och blanda.

Förvaring av komponenter efter första öppnandet

Förvara reagens i sina respektive originalflaskor vid 2 – 8 °C om inte allt material används vid ett tillfälle. Återförslut påsen med M6 Coated Microstrips om inte alla strips används på en gång. Kom ihåg att inkludera torkmedlet.

TMB Substrate och M65 HRP Conjugate är känsliga för exponering av ljus och metalljoner och bör förvaras i de bruna originalflaskorna vid 2 – 8 °C mellan användningstillfällena. Vid användning av nya flaskor ska lösningarna skyddas från ljus. TMB Substrate kan inte användas om det utsatts för ljus.

Förvara den spädda M65 HRP Conjugate-lösningen i flaskan vid 2 – 8 °C om kittet används vid flera tillfällen. Skydda lösningen från ljus. Spädd M65 HRP Conjugate-lösning är hållbar i 3 veckor.

Upplöst Wash Tablet är hållbar i 5 veckor om den förvaras vid 2–8 °C.

Testprocedur

M65® ELISA ska utföras vid rumstemperatur (24 ± 3 °C).

1. Rumstemperera alla komponenter och prover före testsättning. Blanda på vortex före användning.
2. Lös upp Wash Tablet med färskt avjoniserat vatten (se avsnitt "Spädning av komponenter").
3. Späd M65 HRP Conjugate med M65 Conjugate Dilution Buffer och blanda ordentligt (se "Spädning av komponenter").
4. Pipettera 25 µl M65 Standard (A – G), M65 Control Low, M65 Control High eller prov per brunn (duplikat rekommenderas).
5. Tillsätt 75 µl av spädd M65 HRP Conjugate-lösning till varje brunn. ***OBS!*** *Steg 4 och 5 ska utföras utan avbrott inom 20 minuter.*
6. Täck brunnarna med Sealing Tape eller med ett lock för mikrotiterplattor.
7. Inkubera på skak i 2 timmar. Skakhastighet: 600 varv/min.

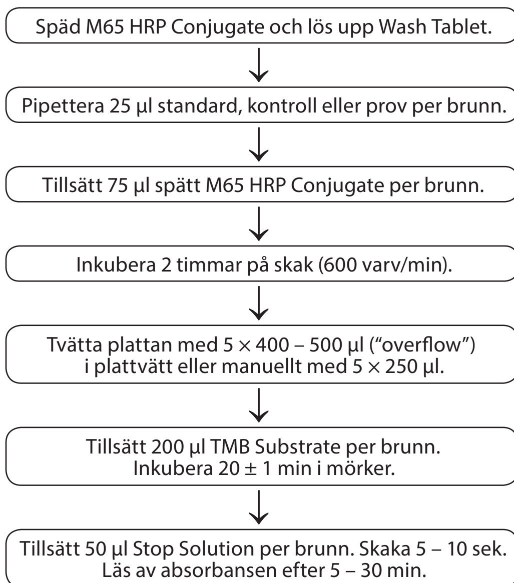
Tvätta plattan i en plattvätt: 5 tvättcykler om 400 – 500 µl/brunn ("overflow"tvätt).

eller

Tvätta plattan manuellt: töm och tvätta plattan 5 gånger med 250 µl upplöst Wash Tablet-lösning. Undvik kontamination mellan brunnarna.

8. Tillsätt 200 µl TMB Substrate i alla brunnar. Inkubera i mörker vid rumstemperatur i 20 ± 1 minuter.
9. Tillsätt 50 µl Stop Solution till alla brunnar. Skaka mikrotiterplattan i 5 – 10 sekunder för att säkerställa att TMB Substrate och Stop Solution är väl blandade. Låt mikrotiterplattan stå i 5 minuter innan avläsning av absorbans.
10. Mät absorbansen i en plattläsare vid 450 nm inom 30 minuter.
11. Beräkna resultaten enligt beskrivning under stycket "Beräkning av resultat".

Flödesschema



Beräkning av resultat

Testresultat från mätningen i M65® ELISA beräknas med hjälp av ett datorprogram. Utvärdera mätvärden för kontroller och prover med hjälp av ett lämpligt program för hantering av denna typ av data. Anpassningsalgoritm: kubisk spline; x-axeln: koncentration i U/l; y-axeln: absorbans vid 450 nm ("A450").

Obs! Om prover har spätts, multiplicera den erhållna koncentrationen med spädningsfaktorn och om blodgivarserum/-plasma har använts för spädning, ta hänsyn till M65-koncentrationen av denna.

Mätmetodens prestanda

Metodens karaktäristik

Mätområde: Mätområdet är 0 – 2 000 U/l.

High dose-effekt: Metoden har ingen high dose-effekt upp till 50 000 U/l.

Reproducerbarhet: Spridningen av mätvärden inom test ("WA % CV") är < 10 % och spridningen av mätvärden mellan test ("BA % CV") är < 10 % för prover > 200 U/l.

Känslighet: Den lägsta detekterbara koncentrationen av M65-antigen som kan mätas med M65® ELISA är 11 U/l, vilket motsvarar den absorbans som ligger 2 standardavvikelser från absorbansen för 0 U/l.

Spiking recovery: Kittets standard innehåller rekombinant material som inte är jämförbart med K18-proteinet som mäts i provet och är därför inte lämpligt att användas för spiking recovery-experiment.

Parallellism/Spädbarhet: Vid spädning av patientsera i M65 Standard A (0 U/l) erhålls i medel 126 % av förväntat värde inom spannet 116 – 139 %. Vid spädning av patientsera i blodgivarserum erhålls i medel 120 % av förväntat värde inom spannet 101 – 133 %. Serum-/plasmaprover > 2 000 U/l kan spädas 1 + 1 med Standard A, men spädning med poolat humanserum rekommenderas.

Referensområde: I serum från 222 svenska blodgivare har medianen bestämts till 264 U/l och den 95:te percentilen till 413 U/l. Det rekommenderas att varje laboratorium fastställer sitt eget referensområde.

Kalibrering

Enheten i M65® ELISA är definierad mot en syntetisk peptid som innehåller M5- och M6-epitoper. 1 U/l = 1,24 pM (ref. 1).

Intern kvalitetskontroll

Att kontrollerna M65 Control Low och M65 Control High överensstämmer med deras angivna koncentrationer bör vara tillräckligt för att säkerställa testets prestanda och bör användas vid varje testtillfälle (duplikat rekommenderas).

Om denna procedur inte är tillräcklig rekommenderas att varje laboratorium upprättar egna interna kontroller enligt vad som anges under stycket "Provtagning och hantering av prover för utvecklingsändamål"

eller enligt interna laboratorierutiner. Dessa kontroller bör frysas i alikvoter och hanteras likadant vid varje testtillfälle.

Metodens begränsningar

Det kliniska värdet av serummätningar av K18 som prognostisk markör eller för monitorering av behandlingssvar är ännu ej fullt klarlagt.

Lipemiska (≤ 1 250 mg/dl), ikteriska (≤ 12,5 mg/dl) eller homolyserade (≤ 100 mg/dl) prover påverkar inte testresultaten.

Litteratur och referenser

1. Kramer *et al.*, Cancer Res 64, 2004, 1751.
2. Hägg *et al.*, Invest New Drugs 20, 2002, 253.
3. Olofsson *et al.*, Clin Cancer Res 13, 2007, 3198.
4. Olofsson *et al.,* Cancer Biomarkers 5, 2009, 117.
5. Greystoke *et al.,* Ann Oncol 19, 2008, 990.
6. Linder *et al.,* Expert Rev Mol Diagn 10, 2010, 353.

För ytterligare referenser, se www.peviva.com/literature.

Garanti

Prestanda för testet har erhållits genom att använda det testförfarande som redovisas ovan. Varje ändring eller modifiering av de testprocedurer som rekommenderas av tillverkaren kan påverka testresultaten. I dessa fall frånsäger sig tillverkaren allt juridiskt ansvar inklusive säljbarhets- och användargaranti. Tillverkaren och dess auktoriserade distributörer ska i dessa fall inte hållas ansvariga för skador som orsakats indirekt eller som en konsekvens.

Gebrauchsanweisung für M65® ELISA

Inhaltsangabe

Erklärung der auf den Etiketten benutzten Symbolen 30
Handelsmarken 30
Lagerung und Versand 30
Testdurchführung 31
Verwendungszweck 31
Zusammenfassung und Erklärung des Tests 31
Testprinzip 31
Reagenzien für 96 Bestimmungen 32
Zusätzlich benötigtes Material 33
Testprotokoll 33
Warnhinweise und Vorsichtsmaßnahmen 33
Blutentnahme und Handhabung der Proben 33
Gewinnung und Handhabung von *in vitro*-Proben nur für die Forschung 34
Verdünnung der Komponenten 35
Lagerung und Haltbarkeit nach dem ersten Öffnen 35
Testdurchführung 36
Flussdiagramm 37
Berechnung der Analysenergebnisse 37
Eigenschaften des Tests 38
Testcharakterisierung 38
Rückverfolgbarkeit des Standards 38
Interne Qualitätskontrolle 38
Grenzen der Methode 39
Literaturhinweise 39
Haftung 39

De

Erklärung der auf den Etiketten benutzten Symbolen



Bestellnummer


Inhalt ausreichend für <n> Prüfungen



Chargenbezeichnung


Hersteller


Temperaturbegrenzung


Verwendbar bis


Gebrauchsanweisung beachten

Handelsmarken

M30®, Apoptosense®, M65®, EpiDeath® und PEVIVA® sind eingetragene Handelsmarken von VLVbio (Vivalavida AB).

Lagerung und Versand

M65® ELISA wird gekühlt versendet und muss zwischen 2 und 8 °C gelagert werden. ***Achtung!*** Nicht Einfrieren!

Testdurchführung

Verwendungszweck

M65® ELISA ist ein einstufiger *in vitro*-Immunoassay zur quantitativen Bestimmung des löslichen Keratins 18 (K18) in Serum und Plasma.

Zusammenfassung und Erklärung des Tests

Extrazelluläres K18 kann als Marker für den epithelialen Zelltod verwendet werden. Während der Nekrose führt der Verlust der Zellmembranintegrität zur Freisetzung intrazellulärer Proteine, einschließlich K18, in den extrazellulären Bereich. Apoptose ist eine aktive Form des Zelltods, die am Anfang die Plasmamembranintegrität schützt, der aber häufig eine sekundäre Nekrose folgt, welche die intrazellulären Komponenten freisetzt. Der M65® ELISA Test misst das gesamte aus den toten Zellen freigesetzte, lösliche K18 (nekrotischer und apoptotischer Herkunft). Messungen von Zellkulturüberständen oder Proben von menschlichem Serum/Plasma mit dem M65® ELISA repräsentieren daher den gesamten epithelialen Zelltod jeglicher Ursache (Ref.1).

K18 wird im Verlauf der Apoptose durch Kaspasen gespalten. Der M30 Apoptosense® ELISA (PEVIVA Prod.-Nr. 10011; Ref. 2) misst speziell den Gehalt an Kaspase-gespaltenen K18-Fragmenten (ccK18), die das K18Asp396-Neoepitop enthalten. Die Kombination von M65® ELISA und M30 Apoptosense® ELISA erleichtert daher die Bestimmung der Art des Zelltodes *in vitro* und im Serum oder Plasma von Patienten (Ref. 1, 3, 4).

Der M65® ELISA verwendet zwei monoklonale Mausantikörper (M5, IgG2b, und M6, IgG2a), die spezifisch mit konventionellen Epitopen des K18 reagieren. Der M5-Antikörper erkennt menschliches K18, reagiert aber nicht mit K18 von Mäusen (Ref. 4). Daher misst der M65® ELISA spezifisch den Tumorzelltod bei Mäusen mit menschlichen Tumorxenotransplantaten (Ref. 4).

M65® ELISA wird in der Forschung und in klinischen Studien im Bereich der Onkologie, Hepatologie, Transplantation und Sepsis verwendet.

Testprinzip

Der M65® ELISA ist ein Festphasen-Enzymimmunoassay. Standards, Kontrollen und Proben reagieren mit einem immobilisierten Fängerantikörper M6, der auf K18 gerichtet ist, und mit dem HRP- (Meerrettichperoxidase) konjugierten Antikörper M5, der auf ein anderes Epitop von K18

gerichtet ist. Ungebundenes Konjugat wird durch einen Waschprozess entfernt. TMB-Substrat wird zugegeben. Die Farbentwicklung wird beendet und die Absorption gemessen. Die resultierende Färbung ist direkt proportional zur Konzentration des Antigengehalts.

Durch Aufzeichnung einer Standardkurve mit bekannten Konzentrationen gegen die gemessene Absorption kann der Antigengehalt in der Probe berechnet werden. Die Konzentration des Antigens wird in Einheiten per Liter (U/l) angegeben.

Reagenzien für 96 Bestimmungen

M6 Coated Microstrips: Eine Mikrotiterplatte, 12 Streifen mit je 8 Testmulden, insgesamt 96 trockene Testmulden. Die Mulden sind mit monoklonalem K18-Mausantikörper M6 beschichtet. Die Mikrotiterplatte befindet sich in einem versiegelten Aluminiumbeutel, der einen Trockenmittelbeutel enthält. Eventuell nicht benötigte Streifen müssen im verschlossenen Beutel zusammen mit dem Trockenmittel aufbewahrt werden. ***Gebrauchsfertig***!

M65 HRP Conjugate: Konzentrat (24 × konz.). Ein Fläschchen mit 0,4 ml monoklonalem Mausantikörper M6 konjugiert mit Meerrettichperoxidase (HRP) in Phosphatpuffer mit Proteinstabilisator. Enthält Konservierungsmittel. Mit M65 Conjugate Dilution Buffer verdünnen. ***Achtung!*** Vor Licht schützen!

M65 Conjugate Dilution Buffer: Ein Fläschchen mit 11 ml Phosphatpuffer mit Proteinstabilisator zur Verdünnung des M65 HRP Conjugates. Enthält Konservierungsmittel. Blaue Lösung. ***Gebrauchsfertig!***

M65 Standard A – G: Standard A bestehend aus 2 ml Phosphatpuffer mit fötalen Kälberserum (FKS). Standard B – G, jeweils 0,5 ml, die das Standardmaterial in Phosphatpuffer mit FKS enthalten. Die Konzentrationen der Standard A – G sind 0, 125, 250, 500, 750, 1.200 und 2.000 U/l. Enthält Konservierungsmittel. Gelbe Lösung. ***Gebrauchsfertig!*** Serum-/Plasmaproben > 2.000 U/l können mit Standard A 1 + 1 verdünnt werden, es wird aber eine Verdünnung mit gepooltem Humanserum empfohlen (siehe Abschnitt „Testcharakterisierung”).

M65 Control Low & High: Zwei 0,5 ml-Fläschchen, die die reaktiven Bestandteile in Phosphatpuffer mit FKS enthalten. Die Konzentrationen der M65 Control Low und High sind auf den entsprechenden Fläschchen angegeben. Enthält Konservierungsmittel. Gelbe Lösung. ***Gebrauchsfertig!***

Wash Tablet: Eine Tablette für 500 ml zubereiteter Waschlösung. Die Wash Tablet in 500 ml frisch deionisiertem Wasser auflösen.

TMB Substrate: Eine Flasche mit 22 ml TMB-Lösung (3,3′,5,5′-Tetramethylbenzidin). ***Achtung!*** Vor Licht schützen! ***Gebrauchsfertig!***

Stop Solution: Ein Fläschchen mit 7 ml 1,0 M Schwefelsäure. ***Gebrauchsfertig!***

Sealing Tape: Eine (1) Lage.

Gebrauchsanweisung.

Analysenzertifikat.

Zusätzlich benötigtes Material

- Absorptionsmessgerät für Mikrotiterplatten (Wellenlänge 450 nm; linear 0 – 3 OD)
- Mikrotiterplattenschüttler (Drehzahl: 600 U/min; Orbit: 1,5 – 4 mm)
- Mikrotiterplattenwascher (für 96 Testmulden) oder Mehrkanalpipette (Volumen 250 µl)
- Wirbelmischer
- Präzisionspipetten: 25, 50, 75 und 200 µl
- Messzylinder (500 ml)
- Deionisiertes Wasser

Testprotokoll

Warnhinweise und Vorsichtsmaßnahmen

1. Der M65® ELISA Kit nur für den *in vitro*-Gebrauch.
2. Reagenzien aus unterschiedlichen Kitchargen dürfen nicht vermischt werden.
3. Alle Patientenproben sind als infektiös anzusehen und vorschriftsgemäß zu behandeln und zu entsorgen.
4. Kontaminierte Proben dürfen nicht verwendet werden.
5. Die Stop Solution enthält 1,0 M Schwefelsäure, die Hautreizungen und Schäden an den Augen verursacht. Bei Kontakt mit reichlich Wasser auswaschen und einen Arzt aufsuchen.
6. Sicherheitsdatenblätter (MSDS) sind unter www.peviva.de oder auf Anfrage erhältlich.

Blutentnahme und Handhabung der Proben

Das Probevolumen sollte so bemessen sein, dass mit jeder Probe jeweils zwei Messungen durchgeführt werden können (Testvolumen: 2 × 25 µl). Spender müssen vor der Blutentnahme nicht nüchtern sein.

Serum: Blutgewinnung durch Venenpunktion in einfachen Röhrchen (ohne Antikoagulans) unter Vermeidung von Hämolyse. Blut gerinnen lassen und Serum nach dem Zentrifugieren aufnehmen.

Plasma: Der M65® ELISA kann auch für Plasmaproben (EDTA, Heparin oder Citrat) verwendet werden.

Achtung! Im Rahmen eines Projekts sollte immer die gleiche Probenart verwendet werden, also entweder Serum oder Plasma (mit gleichem Antikoagulans). Für weitere Informationen über die Leistung von M65® ELISA bei Verwendung unterschiedlicher Probenarten wenden Sie sich bitte an www.peviva.de.

Bewahren Sie die Proben bis zu 4 Stunden bei 2 – 8 °C auf. Bei längerer Lagerung müssen die Proben bei mindestens -20 °C eingefroren werden. Das Einfrieren und Auftauen der Proben beeinträchtigt zwar deren Reaktivität nicht (Ref. 3, 5), doch sollte es nicht unnötig erfolgen. Bezüglich der Verdünnung der Proben siehe Abschnitt "Testcharakterisierung".

Gewinnung und Handhabung von *in vitro*-Proben nur für die Forschung

Der M65® ELISA kann verwendet werden, um den gesamten Zelltod epithelialer Zellen in *in vitro*-Kulturen den über die Freisetzung des K18-Proteins in das Zellkulturmedium zu messen. M65® ELISA und M30 Apoptosense® ELISA können zur Bewertung der Art des Zelltodes durch Berechnung eines M30:M65-Verhältnisses (Ref. 1, 6) verwendet werden. Dieses Verhältnis sollte für jede Karzinomzelllinie mit geeigneten Kontrollen kalibriert werden; d.h. mit Mitteln, die bekanntlich Apoptose einleiten (z. B. genotoxische Substanzen oder Staurosporin) und/oder hauptsächlich Nekrose (z. B. Oligomycinbehandlung nach Glukoseentzug oder Behandlung mit Wasserstoffperoxid) (Ref. 1).

Tag 1: Aussäen der Zellen. Die Saatdichte richtet sich nach der spezifischen Zellart und dem jeweiligen zytotoxischen Mittel; 5.000 – 10.000 Zellen pro Mulde in einer 96-Testmuldenplatte sind im Allgemeinen ausreichend.

Tag 2: Zellen einmal mit PBS waschen und frisches Medium (200 µl/Mulde) zugeben. Die Zellen mit der/den gewünschten Testsubstanz(en) versetzen.

Tag 2 – 4: Das Zellkulturmedium von jeder Probenmulde aufnehmen. Um Austrocknung zu vermeiden, nicht mehrere Proben aus der gleichen Mulde entnehmen. Das Medium zentrifugieren und den zellfreien Überstand für die Analyse verwenden. ***Achtung!*** Aufnahme von Zellen vermeiden. Je Analyse werden 2 × 25 µl zellfreien Überstands verwendet.

Falls die Messung am gleichen Tag durchgeführt wird, können die Proben bei 2 – 8 °C aufbewahrt werden. Für spätere Analysen müssen die Proben bei mindestens -20 °C gelagert werden. Wiederholtes Auftauen und Einfrieren vermeiden.

Verdünnung der Komponenten

Verdünnung des M65 HRP Conjugates

Das M65 HRP Conjugate muss mit M65 Conjugate Dilution Buffer verdünnt werden. Das Fläschchen mit M65 HRP Conjugate enthält genau 0,4 ml. 9,2 ml des M65 Conjugate Dilution Buffer direkt in das Fläschchen mit M65 HRP Conjugate zugeben und mischen.

Auflösen der Wash Tablet

Eine Wash Tablet in 500 ml frisch deionisiertem Wasser auflösen.

Lagerung und Haltbarkeit nach dem ersten Öffnen

Falls nicht der gesamte Kit verwendet wird, müssen die Reagenzien in ihren Originalbehältern bei 2 – 8 °C gelagert werden. Falls nicht alle Mikrotiterstreifen benötigt werden, diese zusammen mit dem Trockenmittelbeutel in den Aluminiumbeutel geben und diesen wieder verschließen.

TMB Substrate und M65 HRP Conjugate sind lichtempfindlich und empfindlich gegenüber Metallionen. Sie müssen bei Nichtgebrauch immer in den originalen Braunglasflaschen bei 2 – 8 °C gelagert werden. Bei Verwendung eines neuen Behälters ist für Lichtschutz zu sorgen! TMB Substrate kann nach Lichteinwirkung nicht mehr benutzt werden.

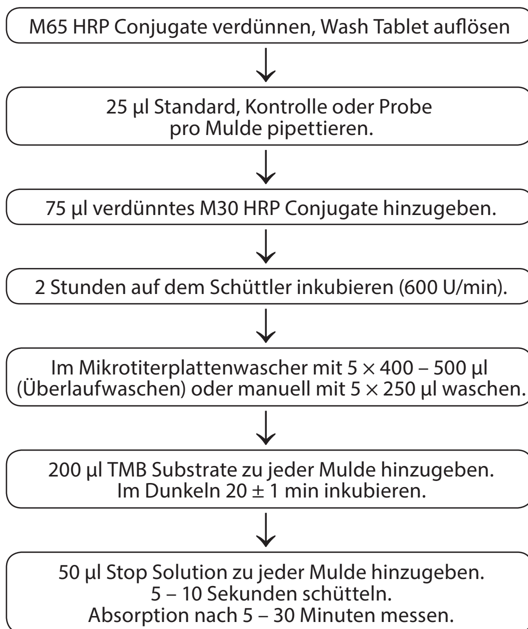
Falls die Verwendung des Kits auf mehrere Male verteilt wird, muss das verdünnte M65 HRP Conjugate im Fläschchen bei 2 – 8 °C gelagert werden. Vor Licht schützen. Die verdünnte M65 HRP Conjugate-Lösung ist 3 Wochen lang haltbar. Die aufgelöste Wash Tablet ist bei Lagerung bei 2 – 8 °C 5 Wochen haltbar.

Testdurchführung

M65® ELISA muss bei Raumtemperatur (24 ± 3 °C) durchgeführt werden.

1. Vor der Testdurchführung alle Reagenzien auf Raumtemperatur bringen. Alle Reagenzien vor Gebrauch vortexen.
2. Wash Tablet in frisch deionisiertem Wasser auflösen (siehe „Verdünnung der Komponenten”).
3. M65 HRP Conjugate mit M65 Conjugate Dilution Buffer verdünnen (siehe „Verdünnung der Komponenten”) und mischen.
4. 25 µl M65 Standard (A – G), M65 Control Low, M65 Control High oder Probe pro Mulde pipettieren (Doppelbestimmungen werden empfohlen).
5. 75 µl der verdünnten M65 HRP Conjugate-Lösung zu jeder Mulde hinzugeben. ***Achtung!*** *Die Schritte 4 und 5 müssen aufeinander folgend, ohne Unterbrechung, innerhalb von 20 Minuten ausgeführt werden.*
6. Mulden mit dem Sealing Tape oder einem Deckel für Mikrotiterplatten abdecken.
7. 2 Stunden auf dem Schüttler inkubieren (Geschwindigkeitseinstellung: 600 U/min).
8. Mikrotiterplatte in einem Mikrotiterplattenwascher 5 Mal mit 400 – 500 µl verdünnter Wash Solution pro Mulde waschen (Überlaufwaschen)
   oder
   Die Mikrotiterplatte von Hand waschen: Inkubationslösung verwerfen und die Mulden 5 Mal mit 250 µl aufgelöster Wash Tablet waschen. Kreuzkontamination zwischen den Mulden vermeiden.
9. 200 µl TMB Substrate zu jeder Mulde hinzugeben. Im Dunkeln bei Raumtemperatur 20 ± 1 Minuten lang inkubieren.
10. 50 µl der Stop Solution pro Mulde hinzugeben. Mikrotiterplatte 5 – 10 Sekunden schütteln, um TMB Substrate und Stop Solution vollständig zu vermischen. Mikrotiterplatte vor der Absorptionsmessung 5 Minuten stehen lassen.
11. Absorption bei 450 nm in einem Absorptionsmessgerät für Mikrotiterplatten innerhalb von 30 Minuten bestimmen und Ergebnisse aufzeichnen.
12. Berechnen der Ergebnisse wie im Abschnitt „Berechnung der Analysenergebnisse“ beschrieben.

Flussdiagramm



De

Berechnung der Analysenergebnisse

Die M65® ELISA Ergebnisse werden mit computerunterstützten Methoden berechnet. Auswerten der Messergebnisse der Kontrollen und Proben mit einem geeigneten Programm für den Umgang mit Daten vom Typ ELISA. Geeigneter Algorithmus: Kubische Splines. x-Achse: Konzentration (U/l); y-Achse: Absorption bei 450 nm (A450).

Achtung! Falls Proben verdünnt wurden, muss die abgelesene Konzentration mit dem Verdünnungsfaktor multipliziert werden, und falls dazu Blutspenderserum/-plasma verwendet wurde, muss dessen Konzentration (U/l) berücksichtigt werden.

Eigenschaften des Tests

Testcharakterisierung

Messbereich: Der Messbereich liegt zwischen 0 und 2.000 U/l.

Hochdosiseffekt: Unterhalb von 50.000 U/l tritt kein Hochdosiseffekt auf.

Reproduzierbarkeit: Für Proben > 200 U/l beträgt die Intra-Assay-Abweichung (Intra-Assay % VK) < 10 % und die Inter-Assay-Abweichung (Inter-Assay % VK) beträgt < 10 %.

Empfindlichkeit: Die nachweisbare Mindestkonzentration von K18 in M65® ELISA liegt bei 11 U/l. Sie ist definiert als die K18-Konzentration, die dem Absorptionswert der zweifachen Standardabweichung vom Absorptionswert des Standard A (0 U/l) entspricht.

Wiederfindung: Der mit dem Kit mitgelieferte Standard enthält rekombinantes Material, das nicht mit dem in der Probe gemessenen K18-Protein vergleichbar ist und nicht für Wiederfindungstests geeignet ist.

Linearität/Verdünnung: Wiederfindung von menschlichem Serum bei einer Verdünnung im M65 Standard A (0 U/l): 126 % (Durchschnitt) und 116 – 139 % (Bereich). Wiederfindung von menschlichem Serum bei Verdünnung im Blutspenderserum: 120 % (Durchschnitt) und 101 – 133 % (Bereich). Serum-/Plasmaproben > 2.000 U/l können mit Standard A 1 + 1 verdünnt werden, es wird aber eine Verdünnung mit gepooltem Humanserum empfohlen.

Referenzbereich: Im Serum von 222 schwedischen Blutspendern lagen der Medianwert bei 264 U/l und das 95. Perzentil bei 413 U/l. Es wird empfohlen, dass jedes Labor seinen eigenen Referenzbereich festlegt.

Rückverfolgbarkeit des Standards

Die mit M65® ELISA gemessenen Einheiten sind in Bezug auf ein synthetisches Peptid definiert, das die Epitope M6 und M5 enthält. 1 U/l = 1,24 pM (Ref. 1).

Interne Qualitätskontrolle

Die mitgelieferten M65 Control Low und High mit ihren jeweiligen Konzentrationen sollten für die Gewährleistung der Funktionalität des Tests ausreichen. Bei jedem Test sind 2 Kontrollen mitzuführen.

Ist diese Vorgehensweise nicht ausreichend, muss das Labor seine eigenen Kontrollen an Hand der Richtlinien in Abschnitt „Gewinnung

und Handhabung von *in vitro*-Proben nur für die Forschung" oder durch individuelle Laborroutinen herstellen. Diese Kontrollen müssen in aliquoten Mengen eingefroren werden und sind bei jeder Messung gleich zu behandeln.

Grenzen der Methode

Der klinische Nutzen der Messung von K18 in menschlichen Blutproben als prognostischer Indikator und in der Patientenbetreuung während der Therapie ist nicht vollständig verifiziert.

Stark lipämische (≤ 1.250 mg/dl), ikterische (≤ 12,5 mg/dl) oder hämolytische (≤ 100 mg/dl) Proben beeinflussen die Messung nicht.

Literaturhinweise

1. Kramer *et al.*, Cancer Res 64, 2004, 1751.
2. Hägg *et al.*, Invest New Drugs 20, 2002, 253.
3. Olofsson *et al.*, Clin Cancer Res 13, 2007, 3198.
4. Olofsson *et al.*, Cancer Biomarkers 5, 2009, 117.
5. Greystoke *et al.*, Ann Oncol 19, 2008, 990.
6. Linder *et al.*, Expert Rev Mol Diagn 10, 2010, 353.

Weitere Literaturhinweise finden Sie auf unserer Webseite unter www.peviva.com/literature.

Haftung

Die hier beschriebenen Leistungsangaben wurden mit dem oben genannten Verfahren erhalten. Jede Abweichung oder Modifikation von diesem durch den Hersteller empfohlenen Verfahren kann die Ergebnisse beeinflussen. In diesem Fall lehnt der Hersteller die Haftung aller ausdrücklichen, implizierten oder gesetzlichen Gewährleistungen ab, einschließlich der gesetzlichen Gewährleistung der Marktfähigkeit und der Gebrauchstauglichkeit. In diesem Fall können der Hersteller und seine auktorisierten Vertriebshändler nicht für indirekte oder Folgeschäden haftbar gemacht werden.

Mode d'emploi du test M65® ELISA

Résumé

- Explication des symboles utilisés sur les étiquettes 42
- Marques déposées 42
- Transport et conservation 42

Description du test 43
- Utilisation prévue 43
- Résumé et explication du test 43
- Principe de la prodédure 44
- Fournitures pour 96 mesures 44
- Matériel nécessaire mais non fourni 45

Procédure du test 45
- Avertissements et précautions 45
- Collecte et préparation des échantillons de sang 46
- Collecte et préparation des échantillons *in vitro* uniquement à usage de recherche 46
- Préparation des composants 47
- Méthode d'analyse 48
- Organigramme 49
- Calcul des résultats de l'analyse 49

Performance du test 50
- Caractéristiques de performance 50
- Traçabilité de l'étalon 50
- Contrôle interne de qualité 50
- Limites de la procédure 51
- Références 51
- Garantie 51

Fr

Explication des symboles utilisés sur les étiquettes

	Référence du catalogue
	Contenu suffisant pour “n” tests
	Code du lot
	Fabricant
	Limites de température
	Utiliser jusque
	Consulter les instructions d’utilisation

Marques déposées

M30®, Apoptosense®, M65®, EpiDeath® et PEVIVA® sont des marques déposées de VLVbio (Vivalavida AB).

Transport et conservation

M65® ELISA doit être transporté au froid et conservé entre 2 et 8 °C. ***Remarque !*** Ne pas congeler !

Description du test

Utilisation prévue

M65® ELISA est un test immunologique *in vitro* en une seule étape permettant de mesurer le taux de kératine 18 (K18) sérique ou plasmatique.

Résumé et explication du test

La K18 extracellulaire peut être utilisée comme marqueur de mort cellulaire pour les cellules épithéliales. Au cours de la nécrose, la perte d'intégrité de la membrane cellulaire se traduit par la libération de protéines intracellulaires, y compris K18, dans le compartiment extracellulaire. L'apoptose représente une forme active de mort cellulaire qui préserve initialement l'intégrité de la membrane plasmique mais souvent suivie de nécrose secondaire à l'endroit où sont libérées les composantes intracellulaires. Le test M65® ELISA mesure l'ensemble de la K18 soluble libérée par les cellules mortes (par nécrose et apoptose). Les mesures faites par le test M65® ELISA à partir du surnageant de cultures cellulaires ou d'échantillons sériques/plasmatiques humains représenteront par conséquent le taux global de mort cellulaire de cellules épithéliales, toutes causes confondues (réf. 1).

Au cours de l'apoptose, K18 est clivée par des caspases. Le test M30 Apoptosense® ELISA (PEVIVA no. prod. 10011; réf. 2) permet de mesurer spécifiquement le taux de fragments de K18 clivés par les caspases (ccK18) et contenant le néo-épitope K18Asp396. L'association des tests M65® ELISA et M30 Apoptosense® ELISA facilitent par conséquent la détermination du type de mort cellulaire *in vitro* et dans le sérum ou le plasma de patients ou d'animaux d'expérimentation avec des xénogreffes de tumeurs humaines (réf. 1, 3, 4).

M65® ELISA fait appel à deux anticorps monoclonaux murins (les clones M5, IgG2b, et M6, IgG2a) spécifiques pour des épitopes conventionnels de K18. L'anticorps M5 détecte la K18 humaine, mais ne réagit pas avec la K18 de souris (réf. 4). M65® ELISA détectera spécifiquement la mort de cellules tumorales chez des souris porteuses de xénogreffes de tumeurs humaines (réf. 4).

M65® ELISA est utilisé pour la recherche et dans le cadre d'études cliniques dans les domaines de l'oncologie, de l'hépatologie, de la transplantation et en cas de sepsie.

Principe de la prodédure

M65® ELISA est un test immunologique enzymatique de type sandwich sur phase solide. Les étalons, les témoins et les échantillons réagissent avec l'anticorps de capture M6 sur phase solide, dirigé contre K18, et l'anticorps M5 conjugué au HRP (peroxidase de raifort) dirigé contre un autre épitope de K18. Tout conjugué non lié est éliminé par une étape de lavage. Le TMB Substrate est ajouté. Le développement de la couleur est arrêté et l'absorbance est alors mesurée. La couleur obtenue est directement proportionnelle à la concentration de l'analyte.

La courbe de référence obtenue à partir de concentrations connues et des mesures d'absorbance correspondantes permet de calculer la quantité d'antigène présent dans l'échantillon. La concentration d'antigène est exprimée en unités par litre (U/l).

Fournitures pour 96 mesures

M6 Coated Microstrips : Une microplaque, 12 barrettes de 8 puits chacune, soit un total de 96 puits secs. Les puits sont tapissés d'anticorps monoclonal de souris anti - K18 "M6". La microplaque est hermétiquement enveloppée dans un sachet d'aluminium contenant un desséchant. Si toutes les barrettes ne sont pas utilisées, refermer le sachet hermétiquement en gardant le desséchant à l'intérieur. ***Prêt à l'emploi !***

Conjugué M65 HRP : Concentré (24 × conc.). Un flacon contenant 0,4 ml d'anticorps monoclonal de souris "M5" (anti - K18) conjugué à de la peroxidase de raifort (HRP) dans un tampon phosphate contenant des protéines stabilisantes. Conservateur ajouté. Doit être dilué avec le tampon M65 Conjugate Dilution Buffer. ***Remarque !*** Ne pas exposer à la lumière !

M65 Conjugate Dilution Buffer : Une ampoule contenant 11 ml de tampon phosphate additionné de protéines stabilisantes pour la dilution du M65 HRP Conjugate. Conservateur ajouté. De couleur bleue. ***Prêt à l'emploi !***

M65 Standard A – G : Standard A contenant 2 ml de tampon phosphate additionné de sérum de veau fétal (SVF). Standard B – G, 0,5 ml chacun, contenant un échantillon étalon dans du tampon phosphate additionné de SVF. Les concentrations des Standard A – G sont de 0, 125, 250, 500, 750, 1 200 et 2 000 U/l, respectivement. Conservateur ajouté. De couleur jaune. ***Prêt à l'emploi !*** Les échantillons de sérum/plasma > 2 000 U/l peuvent être dilués 1 + 1 avec le Standard A, mais il est recommandé d'effectuer la dilution avec un pool de sérum humain (voir la section "Caractéristiques de performance").

M65 Control Low & High : Deux ampoules contenant 0,5 ml de réactifs dans du tampon phosphate additionné de SVF. Les concentrations des

M65 Controls Low & High sont indiquées sur les ampoules respectives. Conservateur ajouté. De couleur jaune. ***Prêt à l'emploi !***

Wash Tablet : Une pastille pour 500 ml de solution de lavage préparée. Dissoudre la Wash Tablet dans 500 ml d'eau fraîche déionisée.

TMB Substrate : Un flacon contenant 22 ml de TMB (3,3',5,5'-Tétraméthylbenzidine) Solution. ***Remarque !*** Ne pas exposer à la lumière ! ***Prêt à l'emploi !***

Stop Solution : Un flacon contenant 7 ml d'acide sulfurique à 1,0 M. ***Prêt à l'emploi !***

Ruban adhésif : Une (1) feuille.

Mode d'emploi.

Certificat d'analyse.

Fr

Matériel nécessaire mais non fourni

- Lecteur de microplaques (longueur d'onde : 450 nm ; linéarité de 0 – 3 A)
- Agitateur de microplaques (oscillation : 600 rpm ; orbite : 1,5 – 4 mm)
- Laveur de microplaques 96 puits ou pipette multicanaux (volume 250 µl)
- Mixer Vortex
- Pipettes de précision : 25, 50, 75 et 200 µl
- Cylindre (500 ml)
- Eau déionisée

Procédure du test

Avertissements et précautions

1. Le kit M65® ELISA est uniquement destiné à un usage *in vitro*.
2. Ne pas mélanger les réactifs de différents lots de kit.
3. Tous les échantillons de patients doivent être considérés comme contagieux et donc manipulés et éliminés conformément à la réglementation applicable.
4. Ne pas utiliser d'échantillons contaminés.
5. La Stop Solution contient de l'acide sulfurique à 1,0 M, susceptible de provoquer une irritation de la peau et néfaste pour les yeux. En cas de contact, laver abondamment avec de l'eau et demander l'avis d'un médecin.
6. Les feuilles de sécurité (MSDS) sont disponibles sur le site www.peviva.com ou sur demande.

Collecte et préparation des échantillons de sang

Le volume de l'échantillon doit être suffisant pour mesurer chaque échantillon en duplicat (volume d'analyse : 2 × 25 µl). Les donneurs ne sont pas tenus d'être à jeun pour la prise de sang.

Sérum : Prélever le sang par ponction veineuse, dans des tubes secs (sans anti-coagulant), en prenant soin d'éviter toute hémolyse, puis laisser coaguler et recueillir le sérum après centrifugation.

Plasma : M65® ELISA peut aussi être utilisé pour des échantillons de plasma (EDTA, héparine ou citrate).

Remarque ! Le même type d'échantillon (sérum ou plasma recueilli par une méthode donnée) doit être utilisé pour un projet donné. Pour plus d'informations sur la performance du test M65® ELISA à partir de différents types d'échantillons, veuillez consulter le site www.peviva.com.

Les échantillons peuvent être conservés entre 2 et 8 °C pendant un maximum de 4 heures. Pour conserver les échantillons plus longtemps, congeler à une température inférieure ou égale à -20 °C. Les échantillons peuvent être congelés-décongelés sans perte d'activité (réf. 3, 5) mais il est recommandé d'éviter toute congélation-décongélation répétée. Pour la dilution des échantillons, voir la section "Caractéristiques de performance".

Collecte et préparation des échantillons *in vitro* uniquement à usage de recherche

M65® ELISA peut être utilisé pour évaluer le taux global de mort cellulaire de cellules épithéliales *in vitro* en mesurant la libération de la protéine K18 dans le milieu de culture. M65® ELISA et M30 Apoptosense® ELISA peuvent être utilisés pour évaluer le type de mort cellulaire en calculant le rapport M30:M65 (réf. 1, 6). Ce rapport doit être calibré pour chaque lignée cellulaire de carcinome à l'aide de témoins appropriés, c'est-à-dire d'agents connus pour induire l'apoptose (ex. agents cytotoxiques ou staurosporine) et/ou principalement la nécrose (ex. traitement par oligomycine de cellules privées de glucose ou traitement par peroxyde d'hydrogène) (réf. 1).

Jour 1 : Semer les cellules. La densité d'ensemencement doit être déterminée pour le type de cellules en question et pour le type d'agent cytotoxique ; 5 000 – 10 000 cellules par puits donnent en général une densité adaptée pour une microplaque 96 puits.

Jour 2 : Laver les cellules une fois avec du PBS et ajouter du milieu frais (200 µl/puits). Exposer les cellules à l'agent ou aux agents de votre choix.

Jour 2 – 4 : Recueillir le milieu de l'échantillon dans chaque puits. Afin d'éviter les effets de dessèchement, il est recommandé de ne pas faire

plusieurs prélèvements à partir d'un même puits. Centrifuger le milieu et recueillir le surnageant sans cellules. ***Remarque !*** Eviter de recueillir des cellules. Utiliser deux échantillons de 25 µl chacun de surnageant sans cellules pour chaque test.

Si le test doit être effectué le même jour, les échantillons peuvent être conservés entre 2 et 8 °C. Les échantillons à analyser ultérieurement devront être conservés à une température inférieure ou égale à -20 °C. Eviter toute congélation-décongélation répétée.

Préparation des composants

Dilution du M65 HRP Conjugate

Diluer le M65 HRP Conjugate avec le tampon M65 Conjugate Dilution Buffer. Le flacon de M65 HRP Conjugate contient exactement 0,4 ml. Ajouter 9,2 ml de M65 Conjugate Dilution Buffer directement au flacon de M65 HRP Conjugate, puis mélanger.

Dissolution de la pastille Wash Tablet

Dissoudre une pastille Wash Tablet dans 500 ml d'eau fraîche déionisée.

Conservation et durée de vie après première ouverture

Si le kit n'est pas entièrement utilisé, conserver les réactifs dans leur emballage d'origine entre 2 et 8 °C. Si toutes les barrettes n'ont pas été utilisées, refermer hermétiquement le sachet de barrettes de microtitration. Ne pas oublier d'inclure le desséchant.

Le TMB Substrate et le M65 HRP Conjugate sont sensibles à la lumière et aux ions métaux et doivent toujours être conservés dans les bouteilles ambrées d'origine à 2 – 8 °C entre deux utilisations. Si un autre récipient est utilisé, celui-ci devra être protégé de la lumière ! Le TMB Substrate ne peut plus être utilisé après avoir été exposé à la lumière.

Si le kit est utilisé à plusieurs reprises, conserver le M65 HRP Conjugate dilué dans le flacon à 2 – 8 °C. Ne pas exposer à la lumière. La solution diluée de M65 HRP Conjugate est stable pendant 3 semaines.

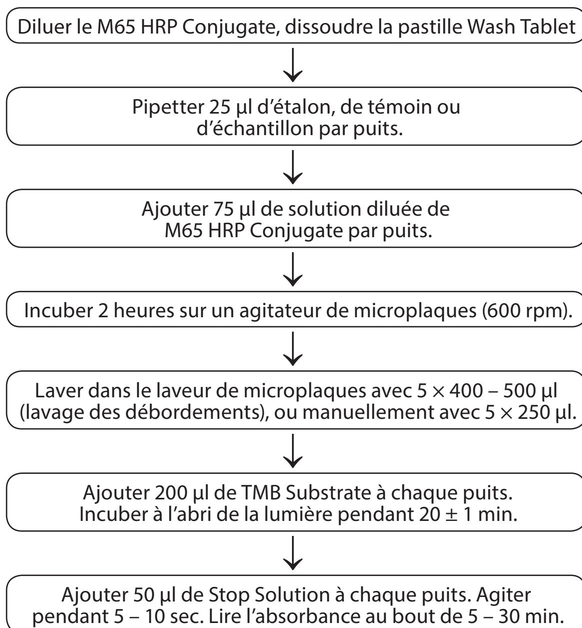
Conservée à 2 – 8 °C, la solution de la pastille Wash Tablet reste stable pendant 5 semaines.

Méthode d'analyse

Le test M65® ELISA doit être effectué à température ambiante (24 ± 3 °C).

1. Laisser les réactifs atteindre la température ambiante avant d'effectuer le test. Mélanger tous les réactifs au Vortex avant utilisation.
2. Diluer la Wash Solution avec de l'eau fraîche déionisée (voir « Préparation des composants »).
3. Diluer le M65 HRP Conjugate avec le tampon M65 Conjugate Dilution Buffer (voir "Préparation des composants") puis mélanger.
4. Pipetter 25 µl de M65 Standard (A – G), de M65 Control Low, de M65 Control High ou d'échantillon par puits (il est recommandé de faire des duplicats).
5. Ajouter 75 µl de la solution diluée de M65 HRP Conjugate à chaque puits. ***Remarque !*** *Les étapes 4 et 5 doivent être exécutées de manière séquentielle sans interruption, dans un délai de 20 minutes.*
6. Couvrir les puits avec du film adhésif ou un couvercle de microplaque.
7. Incuber 2 heures sur un agitateur. Réglage de la vitesse : 600 rpm.
8. Laver la plaque cinq fois dans un laveur de microplaques avec 400 à 500 µl/puits (lavage des débordements)
   ou
   Laver la plaque manuellement, en éliminant la solution d'incubation puis en lavant les puits cinq (5) fois avec 250 µl de la solution de la pastille Wash Tablet. Eviter toute contamination entre les puits.
9. Ajouter 200 µl de TMB Substrate à chaque puits. Incuber à l'abri de la lumière à température ambiante pendant 20 ± 1 minutes.
10. Ajouter 50 µl de Stop Solution à chaque puits. Afin de s'assurer que le TMB Substrate et la Stop Solution sont bien mélangés, agiter la microplaque pendant 5 – 10 secondes. Laisser reposer la microplaque pendant 5 minutes avant de lire l'absorbance.
11. Déterminer l'absorbance à 450 nm dans un lecteur de microplaques, dans un délai de 30 minutes, et enregistrer les résultats.
12. Calculer les résultats comme indiqué dans la section "Calcul des résultats du test".

Organigramme



Fr

Calcul des résultats de l'analyse

Les résultats du test M65® ELISA sont calculés à l'aide d'une méthode assistée par ordinateur. Mesurer les valeurs des témoins et des échantillons à l'aide d'un programme adapté à la manipulation de données de type ELISA. Algorithme d'ajustement : Fonction Cubic Spline. Abscisse : concentration (U/l) ; ordonnée : absorbance à 450 nm (A450).

Remarque ! Si les échantillons ont été dilués, la concentration mesurée doit être multipliée par le facteur de dilution. Dans le cas où du sérum/plasma de donneur est utilisé comme diluant, son taux de M65 (U/l) doit être pris en compte.

Performance du test

Caractéristiques de performance

Plage de mesure : La plage de mesure est de 0 – 2 000 U/l.

Effet de concentration élevée : Aucun effet de concentration élevée n'est observé jusqu'à 50 000 U/l.

Reproductibilité : La variation intra essai (% CV intra essai) est < 10 % et la variation inter essai (% CV inter essai) est < 10 % pour les échantillons > 200 U/l.

Sensibilité : La concentration minimale détectable de K18 dans le test M65® ELISA est de 11 U/l, définie comme étant la concentration de K18 correspondante à l'absorbance dans l'intervalle + 2 écarts-types de l'absorbance du Standard A (0 U/l).

Recouvrement d'échantillons dopés : L'étalon fourni avec le kit contient un produit recombinant qui ne se comporte pas de la même manière que la protéine K18 des échantillons sanguins et n'est donc pas considéré approprié pour les expériences de recouvrement d'échantillons dopés.

Linéarité/Dilution : Recouvrement de sérums humains dilués dans l'étalon M65 Standard A (0 U/l) : 126 % (moyenne) et 116 – 139 % (plage). Recouvrement de sérums humains dilués avec du sérum de donneurs : 120 % (moyenne) et 101 – 133 % (plage). Les échantillons de sérum/plasma > 2 000 U/ L peuvent être dilués 1 + 1 avec le Standard A, mais il est recommandé d'effectuer la dilution avec un pool de sérums humains.

Plage de référence : Pour le sérum de 222 donneurs suédois, la médiane était de 264 U/l et le 95ème centile était de 413 U/l. Il est recommandé que chaque laboratoire établisse sa propre plage de référence.

Traçabilité de l'étalon

Les unités mesurées dans le test M65® ELISA sont définies par rapport à un peptide de synthèse contenant les épitopes M6 et M5. 1 U/l = 1,24 pM (Réf. 1).

Contrôle interne de qualité

Le M65 Control Low & High fournis avec leurs concentrations devraient suffire pour assurer la bonne performance du test et devront être utilisés en duplicats chaque fois qu'un test est effectué.

Si cette procédure ne suffit pas, chaque laboratoire devra établir ses propres témoins selon les recommandations de la section “Collecte et préparation des échantillons *in vitro* à usage de recherche uniquement” ou en fonction des habitudes de chaque laboratoire. Ces témoins doivent être congelés en aliquotes et traités de la même manière chaque fois que le test est effectué.

Limites de la procédure

L’utilité clinique des mesures de K18 dans des échantillons de sang humain en tant qu’indicateurs de pronostic et pour la prise en charge de patients sous protocoles thérapeutiques n’a pas été pleinement établie.

Les échantillons extrêmement lipémiques (≤ 1 250 mg/dL), ictériques (≤ 12,5 mg/dL) ou hémolysés (≤ 100 mg/dL) ne causent pas d’interférence dans ce test.

Références

1. Kramer *et al*., Cancer Res 64, 2004, 1751.
2. Hägg *et al*., Invest New Drugs 20, 2002, 253.
3. Olofsson *et al*., Clin Cancer Res 13, 2007, 3198.
4. Olofsson *et al*., Cancer Biomarkers 5, 2009, 117.
5. Greystoke *et al*., Ann Oncol 19, 2008, 990.
6. Linder *et al*., Expert Rev Mol Diagn 10, 2010, 353.

Pour de plus amples références, veuillez consulter www.peviva.com/literature.

Garantie

Les données de performance présentées ici ont été obtenues par la procédure indiquée. Tout changement ou toute modification de la procédure recommandée par le fabricant est susceptible d’affecter les résultats. Dans cette éventualité, le fabricant renonce à toute garantie explicite, implicite ou statutaire, y compris la garantie implicite à la commercialisation et l’adéquation à une utilisation donnée. Dans cette éventualité, le fabricant et ses distributeurs agréés ne sauront être tenus pour responsables de dommages directs ou indirects.

Istruzioni per l’uso del kit ELISA M65®

Indicazione del contenuto

Spiegazione dei simboli utilizzati sulle etichette 54
Marchi 54
Trasporto e conservazione 54
Descrizione del test 55
Scopo proposto 55
Sommario e spiegazione del test 55
Principio del procedimento 55
Reagenti forniti per 96 determinazioni 56
Materiale occorrente non incluso 57
Procedimento del test 57
Precauzioni e avvertenze 57
Prelievo e preparazione dei campioni di sangue 57
Prelievo e preparazione dei campioni *in vitro* solo per uso ricerca 58
Preparazione del componente 59
Conservazione e durata dopo la prima apertura 59
Procedimento del test 60
Schema del procedimento 61
Calcolo dei risultati analitici 61
Prestazioni del test 62
Caratteristiche delle prestazioni 62
Tracciabilità dello standard 62
Controllo di qualità interno 62
Limitazioni del procedimento 63
Letteratura di riferimento 63
Garanzia 63

It

Spiegazione dei simboli utilizzati sulle etichette

	Numero di catalogo
	Contenuto sufficiente per "n" saggi
	Codice del lotto
	Fabbricante
	Limiti di temperatura
	Utilizzare entro
	Consultare le instruzioni per l'uso

Marchi

M30®, Apoptosense®, M65®, EpiDeath® e PEVIVA® sono marchi registrati di VLVbio (Vivalavida AB)

Trasporto e conservazione

Il kit ELISA M65® viene spedito in condizioni di raffreddamento e deve essere conservato ad una temperatura tra i 2 – 8 °C. ***Nota!*** Non congelare!

Descrizione del test

Scopo proposto

ELISA M65® è un metodo immunologico diretto *in vitro* per la determinazione quantitativa della cheratina solubile 18 (K18) nel siero e nel plasma.

Sommario e spiegazione del test

La K18 extracellulare può essere utilizzata come marcatore della morte delle cellule epiteliali. Durante la necrosi, la perdita dell'integrità della membrana cellulare avrà come conseguenza il rilascio di proteine intracellulari, compresa la K18, nel compartimento extracellulare. L'apoptosi rappresenta una forma attiva di morte cellulare che inizialmente conserva l'integrità della membrana del plasma, ma che è generalmente seguita da una necrosi secondaria nella quale vengono rilasciati componenti intracellulari. Il test ELISA M65® quantifica la K18 solubile totale rilasciata dalle cellule morte (necrotiche e apoptotiche). Le misurazioni dei campioni da sovranatanti di colture cellulari o da siero/plasma umano con il kit ELISA M65® illustrano dunque la morte totale delle cellule epiteliali per qualsiasi causa (ref. 1).

La K18 viene scissa dalle caspasi durante l'apoptosi. Il test ELISA M30 Apoptosense® (n. prod. PEVIVA 10011; ref. 2) misura in modo specifico il livello dei frammenti solubili tagliati dalla caspasi della K18 (ccK18) contenenti il neoepitopo K18Asp396. La combinazione di ELISA M65® e di ELISA M30 Apoptosense® facilita dunque la determinazione della modalità di morte cellulare *in vitro* e in siero o plasma di pazienti o animali da laboratorio con tumore umano xenotrapiantato (ref. 1, 3, 4).

ELISA M65® utilizza due anticorpi monoclonali di topo (clone M5, IgG2b e M6, IgG2a) specifici per epitopi convenzionali della K18. L'anticorpo M5 rileva la K18 umana, ma non reagisce con la K18 del topo (ref. 4). ELISA M65® rileverà in modo specifico la morte delle cellule tumorali nei topi portatori di tumore umano xeno trapiantato (ref. 4).

ELISA M65® è utilizzato per la ricerca e la sperimentazione clinica nei campi dell'oncologia, epatologia, trapianti e sepsi.

Principio del procedimento

ELISA M65® è un test immunoenzimatico tipo 'sandwich' in fase solida. Gli standard, i controlli e i campioni reagiscono con un anticorpo di cattura

“M6” in fase solida, diretto contro K18, e con l’anticorpo M5 coniugato con HRP (perossidasi di rafano), diretto contro un epitoto diverso della K18. Il coniugato non legato viene rimosso mediante lavaggio. Si aggiunge il substrato TMB. Si blocca lo sviluppo del colore e si legge l’assorbanza. Il colore risultante è direttamente proporzionale alla concentrazione dell’analita.

La quantità di antigene nel campione può essere calcolata da una curva standard sulla quale sono riportate concentrazioni note in funzione dell’assorbanza misurata. La concentrazione dell’antigene è espressa in unità per litro (U/l).

Reagenti forniti per 96 determinazioni

M6 Coated Microstrips: Una micropiastra, 12 strisce con 8 pozzetti ciascuna, 96 pozzetti asciutti in tutto. I pozzetti sono rivestiti di anticorpo monoclonale K18 di topo, “M6”. La micropiastra è chiusa ermeticamente in una busta di alluminio, contenente un essiccante. Se non si usano tutte le strisce, richiudere ermeticamente la busta, senza rimuovere l’agente essiccante. ***Pronto per l’uso!***

M65 HRP Conjugate: Concentrato (24 × conc.). Una fiala contenente 0,4 ml di anticorpo monoclonale M5 di topo (anti-K18) coniugato con perossidasi di rafano (HRP) in tampone fosfato con stabilizzante di proteine. Conservanti aggiunti. Deve essere diluito con M65 Conjugate Dilution Buffer. ***Nota!*** Non esporre alla luce!

M65 Conjugate Dilution Buffer: Una fiala contenente 11 ml di tampone fosfato con stabilizzanti di proteine per la diluizione di M65 HRP Conjugate. Conservanti aggiunti. Di colore blu. ***Pronto per l’uso!***

M65 Standard A – G: Lo Standard A contenente 2 ml di tampone fosfato con siero fetale bovino. Gli Standard B – G, 0,5 ml ciascuno, contengono materiale standard in tampone fosfato con siero fetale bovino. I valori degli Standard A – G sono 0, 125, 250, 500, 700, 1.200 e 2.000 U/l, rispettivamente. Conservanti aggiunti. Di colore giallo. ***Pronto per l’uso!*** Campioni di siero/plasma > di 2.000 U/l possono essere diluiti con un rapporto di 1 + 1 con Standard A. Tuttavia, si consiglia la diluizione con pool di siero umano (si veda la sezione “Caratteristiche delle prestazioni”).

M65 Control Low & High: Due fiale contenenti 0,5 ml di componenti reattivi in tampone fosfato con siero fetale bovino. I valori dei M65 Controls Low e High sono indicati sulle rispettive fiale. Conservanti aggiunti. Di colore giallo. ***Pronto per l’uso!***

Wash Tablet: una pastiglia per 500 ml di wash solution preparata. Dissolvere la Wash Tablet in 500 ml di acqua fresca deionizzata.

TMB Substrate: Una bottiglia contenente 22 ml di soluzione TMB (3,3’,5,5’-tetrametilbenzidina). ***Nota!*** Non esporre alla luce! ***Pronto per l’uso!***

Stop Solution: Una fiala contenente 7 ml di 1,0 M acido solforico. ***Pronto per l'uso!***

Sealing Tape: Un (1) foglio.

Istruzioni per l'uso.

Certificato di analisi.

Materiale occorrente non incluso

- Lettore di micropiastre (lunghezza d'onda 450 nm, densità ottica lineare da 0 – 3)
- Agitatore per micropiastre (oscillazioni: 600 rpm; orbita: 1,5 – 4 mm)
- Dispositivo per il lavaggio di micropiastre a 96 pozzetti o pipetta multicanale (volume 250 µl)
- Scuotitore Vortex
- Pipette di precisione: 25, 50, 75 e 200 µl
- Cilindro (500 ml)
- Acqua deionizzata

Procedimento del test

Precauzioni e avvertenze

1. Il kit ELISA M65® è previsto unicamente per l'uso *in vitro*.
2. Non mescolare i reagenti di differenti lotti del kit.
3. Tutti i campioni prelevati da pazienti devono essere considerati come contagiosi e quindi manipolati ed eliminati in modo appropriato.
4. Non usare campioni contaminati.
5. La Stop Solution contiene acido solforico 1,0 M che causa irritazione alla pelle ed è dannoso per gli occhi. In caso di contatto, risciacquare abbondantemente con acqua e consultare un medico.
6. Le schede di sicurezza (MSDS) sono disponibili al sito www.peviva.com o su richiesta.

Prelievo e preparazione dei campioni di sangue

Il volume del campione dovrebbe essere sufficiente per misurare ogni campione in duplicato (volume del test 2 × 25 µl). I donatori non devono essere a digiuno prima del prelievo di sangue.

Siero: Conservare il sangue venoso prelevato, evitando l'emolisi, in provette normali (senza anticoaugulante), consentire al sangue di coagularsi e prelevare il siero dopo la centrifugazione.

Plasma: ELISA M65® può essere usato anche per campioni di plasma (EDTA, eparina o citrato).

Nota! Lo stesso tipo di materiale, per esempio siero o plasma prelevato con lo stesso metodo, dovrebbe essere usato per un progetto specifico. Per ulteriori informazioni sulle prestazioni di ELISA M65® con diversi tipi di campione, si prega di consultare www.peviva.com.

Conservare i campioni a 2 – 8 °C fino a 4 ore. Per periodi più lunghi, conservare i campioni congelati a -20 °C o a temperature inferiori. I campioni possono essere congelati-scongelati senza perdita di attività (ref. 3, 5), ma si raccomanda di evitare cicli ripetuti e non necessari di ricongelamento-scongelamento. Per la diluizione dei campioni, si veda la sezione “Caratteristiche delle prestazioni”.

Prelievo e preparazione dei campioni *in vitro* solo per uso ricerca

ELISA M65® può essere impiegato per stabilire la morte cellulare totale delle cellule epiteliali *in vitro* misurando il rilascio della proteina K18 all’interno del mezzo di coltura. ELISA M65® ed ELISA M30 Apoptosense® possono essere impiegati per stabilire la modalità di morte cellulare mediante il calcolo di un “rapporto M30:M65” (ref. 1, 6). Il rapporto deve essere calibrato per ogni linea cellulare di carcinoma mediante controlli appropriati: noti induttori di apoptosi (p. es. agenti genotossici o staurosporina) e/o principalmente di necrosi (p. es. trattamento con oligomicina di cellule con gravi carenze di glucosio o trattamento con acqua ossigenata) (ref. 1).

Giorno 1: Piastrare le cellule. La densità iniziale deve essere determinata per ogni tipo di cellula e agente citotossico; solitamente, sono sufficienti 5.000-10.000 cellule per pozzetto in una piastra da 96 pozzetti.

Giorno 2: Lavare le cellule una sola volta con PBS e aggiungere mezzo fresco (200 µl/pozzetto). Esporre le cellule all’agente (o agli agenti) desiderato (i).

Giorno 2 – 4: Prelevare il mezzo del campione da ogni pozzetto. Per evitare che il pozzetto vada a secco, si sconsiglia di prelevare più campioni dallo stesso pozzetto. Centrifugare il mezzo e prelevare il sovranatante privo di cellule. ***Nota!*** Evitare di prelevare cellule. Per ogni test si usano campioni di 2 × 25 µl di sovranatante privo di cellule.

Se il saggio viene eseguito lo stesso giorno, i campioni possono essere conservati a 2 – 8 °C. I campioni che verranno analizzati in un secondo tempo devono essere conservati a -20 °C o a temperature inferiori. Evitare cicli ripetuti di congelamento-scongelamento.

Preparazione del componente

Diluizione di M65 HRP Conjugate

Diluire M65 HRP Conjugate con M65 Conjugate Dilution Buffer. Una fiala di M65 HRP Conjugate contiene esattamente 0,4 ml di prodotto. Aggiungere 9,2 ml di M65 Conjugate Dilution Buffer direttamente alla fiala di M65 HRP Conjugate, quindi miscelare.

Dissoluzione della Wash Tablet

Dissolvere una Wash Tablet in 500 ml di acqua fresca deionizzata.

Conservazione e durata dopo la prima apertura

Se non si utilizza l'intero kit, conservare i reagenti nei loro contenitori originali a 2 – 8 °C. Se non si utilizzano tutte le strisce, richiudere ermeticamente la busta di microstrisce. Ricordarsi di includere l'essiccante.

TMB Substrate e M65 HRP Conjugate sono sensibili alla luce e agli ioni metallici e devono essere costantemente conservati nelle bottiglie ambrate originali a 2 – 8 °C, quando non sono usati. Se si utilizza un nuovo contenitore, questo deve essere protetto dalla luce! TMB Substrate non può essere utilizzato dopo l'esposizione alla luce.

Se il kit viene utilizzato più volte, conservare M65 HRP Conjugate diluito nella fiala a 2 – 8 °C. Non esporre alla luce. La soluzione diluita di M65 HRP Conjugate è stabile per 3 settimane.

La soluzione preparata della Wash Tablet rimane stabile per 5 settimane se conservata a 2 – 8 °C.

Procedimento del test

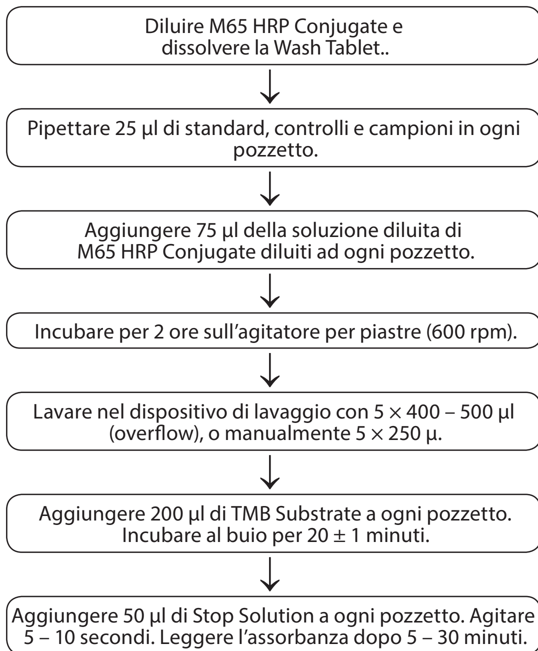
Il test con ELISA M65® deve essere eseguito a temperatura ambiente (24 ± 3 °C).

1. Tutti i reagenti devono essere a temperatura ambiente prima di eseguire il test. Agitare tutti i reagenti con scuotitore Vortex prima dell’uso.
2. Dissolvere la Wash Tablet in acqua fresca deionizzata (vedi “Preparazione del componente”).
3. Diluire M65 HRP Conjugate con M65 Conjugate Dilution Buffer e mescolare (vedi “Preparazione del componente”).
4. Pipettare 25 µl di M65 Standard (A-G), M65 Control Low, M65 Control High o campione per pozzetto (si raccomandano duplicati).
5. Aggiungere 75 µl della soluzione diluita di M65 HRP Conjugate a ogni pozzetto. ***Nota!*** I passaggi 4 e 5 dovrebbero essere eseguiti sequenzialmente senza interruzioni, entro 20 minuti.
6. Coprire i pozzetti con del nastro sigillante o un coperchio apposito per micropiastre.
7. Incubare sull’agitatore per due (2) ore. Velocità di agitazione: ~ 600 rpm.

Lavare cinque volte la piastra nell’apposito dispositivo di lavaggio delle micropiastre con 400–500 µl/pozzetto (lavaggio overflow)
oppure
lavare la piastra manualmente, scartando la soluzione di incubazione e lavando i pozzetti cinque (5) volte con 250 µl della soluzione preparata della Wash Tablet. Evitare contaminazioni tra i pozzetti.

8. Aggiungere 200 µl di TMB Substrate a ogni pozzetto. Incubare al buio e a temperatura ambiente per 20 ± 1 minuti.
9. Aggiungere 50 µl di Stop Solution a ogni pozzetto. Per consentire la miscelazione completa di TMB Substrate con Stop Solution, agitare la micropiastra per 5 - 10 secondi. Attendere 5 minuti prima di procedere alla lettura dell’assorbanza.
10. Entro 30 minuti, determinare l’assorbanza a 450 nm mediante un lettore di micropiastre e prendere nota dei risultati.
11. Calcolare i risultati come descritto nella sezione “Calcolo dei risultati analitici”.

Schema del procedimento



It

Calcolo dei risultati analitici

I risultati del test ELISA M65® vengono calcolati utilizzando dei metodi computerizzati. Calcolare i valori dei controlli e dei campioni con un programma adatto all'elaborazione dei dati del test ELISA. Algoritmo di approssimazione: Cubic Spline. Asse-x: concentrazione (U/l). Asse-y: assorbanza a 450 nm (A450).

Nota! Se i campioni sono stati diluiti, la concentrazione determinata deve essere moltiplicata per il fattore di diluizione e, nel caso sia stato utilizzato siero/plasma di un donatore, bisogna tener conto della concentrazione (U/l) di M65 del donatore.

Prestazioni del test

Caratteristiche delle prestazioni

Intervallo di determinazione: L’intervallo di determinazione è 0 – 2.000 U/ L.

Effetto dovuto a dose alta: Non è stato riscontrato alcun effetto da dose alta fino a 50.000 U/l.

Riproducibilità: La variazione all’interno di un test è < 10 % (CV) e la variazione tra test è < 10 % (CV) per campioni > 200 U/l.

Sensibilità: La concentrazione minima misurabile di neoepitopo K18 con ELISA M65® è 11 U/l, definita come la concentrazione di K18 corrispondente a un’assorbanza superiore di due deviazioni standard all’assorbanza dello Standard A(0 U/l).

Spiking recovery: Lo standard incluso nel kit contiene materiale ricombinante, non paragonabile al K18 misurato nel campione e inadatto a test di spiking recovery (recupero dopo aggiunta).

Linearità/Diluizione: Recupero da sieri umani diluiti in M65 Standard A (0 U L): 126 % (media) e 116 – 139 % (intervallo). Recupero da sieri umani diluiti in siero di donatori: 120 % (media) e 101 – 133 % (intervallo). Campioni di siero/plasma > di 2.000 U/l possono essere diluiti con un rapporto di 1 + 1 con Standard A. Tuttavia, si consiglia la diluizione con pool di siero umano.

Intervallo di riferimento: Nel siero di 222 donatori svedesi, la media era di 264 U/l e il 95º percentile era 413 U/l. Si consiglia che ogni laboratorio definisca il proprio intervallo di riferimento.

Tracciabilità dello standard

Le unità determinate da ELISA M65® sono definite contro un peptide sintetico contenente gli epitopi “M6” e “M5”. 1 U/l = 1,24 pM (ref. 1).

Controllo di qualità interno

I controlli Low e High inclusi con le loro concentrazioni dovrebbero essere sufficienti per garantire la prestazione del test e dovrebbero essere impiegati in duplicato ogni volta che si esegue il test.

Se questo procedimento non fosse sufficiente, ciascun laboratorio deve stabilire i propri controlli, secondo quanto indicato alla sezione “Prelievo e preparazione dei campioni *in vitro* solo per uso ricerca” o secondo le

tecniche di routine del laboratorio. Tali controlli dovrebbero essere congelati in aliquote e trattati nello stesso modo ogni volta che si esegue il test.

Limitazioni del procedimento

L'utilità clinica della misurazione di K18 in campioni di sangue umano come indicatore prognostico e nella cura dei pazienti sottoposti a regimi di terapia non è stata completamente stabilita.

I campioni fortemente lipemici (≤ 1.250 mg/dl), itterici (≤ 12,5 mg/dl) o emolizzati (≤ 100 mg/dl) non interferiscono con il test.

Letteratura di riferimento

1. Kramer *et al*., Cancer Res 64, 2004, 1751.
2. Hägg *et al*., Invest New Drugs 20, 2002, 253.
3. Olofsson *et al*., Clin Cancer Res 13, 2007, 3198.
4. Olofsson *et al*., Cancer Biomarkers 5, 2009, 117.
5. Greystoke *et al*., Ann Oncol 19, 2008, 990.
6. Linder *et al*., Expert Rev Mol Diagn 10, 2010, 353.

Per ulteriori informazioni, consultare il sito www.peviva.com/literature (in lingua inglese e tedesca).

Garanzia

I dati di prestazione presentati sono stati ottenuti usando il procedimento qui descritto. Qualsiasi cambiamento o modifica rispetto al procedimento raccomandato dal produttore potrebbe alterare i risultati. In tal caso, il produttore annulla qualsiasi garanzia esplicita, implicita o prevista per legge, inclusa la garanzia della commerciabilità e dell'idoneità del prodotto all'uso. In tale eventualità, il produttore e i suoi distributori autorizzati declinano ogni responsabilità per danni diretti o indiretti.

Instrucciones de uso del M65® ELISA

Resumen

Explicación de los símbolos utilizados en las etiquetas 66
Marcas comerciales 66
Envío y almacenamiento 66
Descripción del análisis 67
Objetivo previsto 67
Resumen y explicación de la prueba 67
Principio del método 67
Materiales suministrados para 96 determinaciones 68
Materiales necesarios pero no incluidos 69
Protocolo del ensayo 69
Advertencias y precauciones 69
Obtención y preparación de muestras de sangre 69
Obtención y preparación de muestras *in vitro* para el uso en investigaciones exclusivamente 70
Preparación de los componentes 71
Almacenamiento y periodo de validez despuésde abrirlo por primera vez 71
Procedimiento de análisis 72
Flujograma 73
Cálculo de resultados analíticos 73
Funcionamiento del análisis 74
Características del rendimiento 74
Trazabilidad del estándar 74
Control de calidad interno 74
Limitaciones del método 75
Referencias bibliográficas 75
Garantía 75

Es

Explicación de los símbolos utilizados en las etiquetas



Número de catálogo



Contenido suficiente para <n> ensayos



Código del lote


Fabricante


Límite de temperatura


Fecha de caducidad


Consulte las instrucciones de uso

Marcas comerciales

M30®, Apoptosense®, M65®, EpiDeath® y PEVIVA® son marcas comerciales registradas de VLVbio (Vivalavida AB).

Envío y almacenamiento

El M65® ELISA se envía en condiciones refrigeradas y debe almacenarse a entre 2 y 8 °C. ***Nota:*** ¡No congelar!

Descripción del análisis

Objetivo previsto

El M65® ELISA es un inmunoanálisis *in vitro* de un paso para la determinación cuantitativa en suero y plasma de queratina 18 (K18) soluble.

Resumen y explicación de la prueba

La K18 extracelular se puede usar como marcador de la muerte celular epitelial. Durante la necrosis, la pérdida de la integridad de la membrana celular dará lugar a la liberación de proteínas intracelulares, incluyendo K18, en el compartimento extracelular. La apoptosis representa una forma activa de muerte celular que preserva inicialmente la integridad de la membrana plasmática, pero que va seguida normalmente de necrosis secundaria donde los componentes intracelulares son liberados. El análisis M65® ELISA mide la K18 soluble total liberada de las células muertas (necróticas y apoptóticas). Las mediciones de sobrenadantes de cultivos celulares o las muestras séricas/plasmáticas humanas mediante M65® ELISA representarán, por lo tanto, la muerte celular epitelial total por cualquier causa (ref. 1).

K18 es degradada por las caspasas durante la apoptosis. El análisis M30 Apoptosense® ELISA (producto de PEVIVA n.º 10011; ref. 2) mide específicamente el nivel de fragmentos de K18 degradada por caspasa (ccK18) que contienen el neoepítopo K18Asp396. La combinación de M65® ELISA y M30 Apoptosense® ELISA facilita así la determinación del modo de muerte celular *in vitro* y en el suero o el plasma de los pacientes o animales experimentales con xenoinjertos tumorales humanos (ref. 1, 3, 4).

M65® ELISA utiliza dos anticuerpos monoclonales murinos (clon M5, IgG2b y M6, IgG2a) específicos para los epítopos convencionales de K18. El anticuerpo M5 detecta la K18 humana, pero no reacciona a la K18 murina (ref. 4). M65® ELISA detecta específicamente la muerte celular tumoral en ratones portadores de xenoinjertos tumorales humanos (ref. 4).

M65® ELISA se usa para ensayos de investigación y clínicos en los campos de la oncología, hepatología, transplantes y sepsis.

Es

Principio del método

M65® ELISA es un enzimoinmunoanálisis de tipo sándwich en fase sólida. Los estándares, los controles y las muestras reaccionan con M6, un anti-

cuerpo receptor en fase sólida contra K18, y con el anticuerpo M5 contra un epítopo diferente de K18 conjugado con HRP (peroxidasa de rábano picante). El conjugado no unido se elimina en un paso de lavado. Se añade sustrato TMB. El desarrollo del color se detiene y se lee la absorbancia. El color resultante es directamente proporcional a la concentración del analito.

Representando una curva estándar a partir de las concentraciones conocidas frente a la absorbancia medida, se puede calcular la cantidad de antígeno que hay en la muestra. La concentración del antígeno se expresa en unidades por litro (U/l).

Materiales suministrados para 96 determinaciones

M6 Coated Microstrips: Una microplate, 12 tiras con 8 pocillos cada una, 96 pocillos secos en total. Los pocillos están recubiertos con anticuerpo monoclonal K18 de ratón M6. La microplaca viene sellada dentro de una bolsa de aluminio que contiene un desecante. Si no se usan todas las tiras, vuelva a sellar la bolsa con el desecante dentro. ***Listo para usar***.

M65 HRP Conjugate: Concentrado (24 × conc). Un vial que contiene 0,4 ml de anticuerpo monoclonal M5 de ratón (anti-K18) conjugado con peroxidasa de rábano picante (HRP) en amortiguador fosfato con estabilizadores proteicos. Conservante añadido. Debe diluirse con M65 Conjugate Dilution Buffer. ***Nota***: ¡No exponer a la luz!

M65 Conjugate Dilution Buffer: Un vial que contiene 11 ml de amortiguador fosfato con estabilizadores proteicos para la dilución del M65 HRP Conjugate. Conservante añadido. De color azul. ***Listo para usar.***

M65 Standard A – G: Standard A contiene 2 ml de tampón de fosfato con suero bovino fetal (SBF). Los Standard B – G, de 0,5 ml cada uno, contienen material estándar en suero bovino fetal con tampón de fosfato. Los valores de los Standard A – G son 0, 125, 250, 500, 750, 1.200 y 2.000 U/l, respectivamente. Conservante añadido. De color amarillo. ***Listo para usar***. Las muestras de suero/plasma > 2.000 U/l se pueden diluir 1 + 1 con el Standard A, pero se recomienda la dilución con suero humano agrupado (ver sección "Características del funcionamiento").

M65 Control Low & High: Dos viales de 0,5 ml que contienen reactivos en suero bovino fetal con amortiguador fosfato. Los controles bajo (Low) y alto (High) de M65 se indican en los viales respectivos. Conservante añadido. De color amarillo. ***Listo para usar.***

Wash Tablet: Un comprimido para 500 ml de solución de lavado preparada. Disolver Wash Tablet en 500 ml de agua desionizada fresca.

TMB Substrate: Un frasco que contiene 22 ml de solución TMB (3,3',5,5'-tetrametilbenzidina). ***Nota***: ¡No exponer a la luz! ***Listo para usar.***

Stop Solution: Un vial que contiene 7 ml de ácido sulfúrico 1,0 M. ***Listo para usar.***

Sealing Tape: Una (1) lámina de cinta para sellar.

Instrucciones de uso.

Certificado de análisis.

Materiales necesarios pero no incluidos

- Lector de microplacas (longitud de onda: 450 nm; lineal 0 – 3 de densidad óptica)
- Agitador de microplacas (oscilación: 600 rpm; órbita: 1,5 – 4 mm)
- Limpiador de placa de microvaloración de 96 pocillos o pipeta multicanal (volumen: 250 µl)
- Agitador vortex
- Pipetas de precisión: 25, 50, 75 y 200 µl
- Cilindro (500 ml)
- Agua desionizada

Protocolo del ensayo

Advertencias y precauciones

1. El kit M65® ELISA está destinado exclusivamente para el uso *in vitro*.
2. No mezcle reactivos de kits de distintos lotes.
3. Todas las muestras de pacientes deben considerarse contagiosas y manipularse y desecharse de acuerdo con las normativas correspondientes.
4. No use muestras contaminadas.
5. La solución Stop Solution contiene ácido sulfúrico 1,0 M, el cual provoca irritación de la piel y es nocivo para los ojos. En caso de contacto, lávese con agua abundante y solicite atención médica.
6. Las hojas de datos de seguridad de materiales (MSDS) están disponibles en www.peviva.com o se pueden solicitar.

Obtención y preparación de muestras de sangre

El volumen de la muestra debe ser suficiente para hacer el análisis por duplicado (volumen del test 2 × 25 µl). Los donantes no tienen que ayunar antes de la extracción de sangre.

Suero: Extraiga sangre mediante venopunción, evitando la hemólisis, en tubos secos (sin anticoagulante), deje coagular la sangre y recoja el suero después de la centrifugación.

Plasma: M65® ELISA también se puede usar para muestras de plasma (tubos con EDTA, heparina o citrato).

Nota: para un proyecto concreto se debe utilizar el mismo tipo de material, es decir, suero o plasma obtenido por el mismo método. Para obtener información adicional sobre el funcionamiento de M65® ELISA con distintos tipos de muestras, consulte www.peviva.com.

Guarde las muestras a 2 – 8 °C hasta un máximo de 4 horas. Para períodos más largos, guárdelas congeladas a temperaturas de -20 °C o inferiores. Las muestras se pueden congelar y descongelar sin pérdida de la actividad (ref. 3, 5), pero se recomienda evitar congelar y descongelarlas repetidas veces. Para la dilución de las muestras, consulte la sección “Características del funcionamiento”.

Obtención y preparación de muestras *in vitro* para el uso en investigaciones exclusivamente

M65® ELISA se puede usar para evaluar la muerte celular total de las células epiteliales *in vitro* midiendo la liberación de la proteína K18 en el medio de cultivo. M65® ELISA y M30 Apoptosense® ELISA se pueden usar para valorar el modo de muerte celular calculando la relación M30:M65 (ref. 1, 6). La relación se debe calibrar para cada línea celular de carcinoma usando los controles apropiados; es decir, agentes que se sabe que inducen la apoptosis (por ej.: agentes genotóxicos o estaurosporina) y/o principalmente la necrosis (por ej.: tratamiento con oligomicina de células con carencia de glucosa o tratamiento con peróxido de hidrógeno) (ref. 1).

Día 1: Siembre las células. La densidad de siembra deberá determinarse con respecto al tipo de célula y al agente citotóxico; suele ser suficiente una densidad de 5.000 – 10.000 células por pocillo en una placa de 96 pocillos.

Día 2: Lave las células una vez con PBS y añada medio fresco (200 µl/pocillo). Exponga las células al agente o a los agentes deseados.

Día 2 – 4: Recoja las muestras de medio de cada pocillo. Para evitar efectos de secado, no se recomienda recoger varias muestras del mismo pocillo. Centrifugue el medio y obtenga el sobrenadante sin células. ***Nota***: evite recoger células. se usan 2 – 25 µl de muestras de sobrenadante sin células para cada análisis.

Si el análisis se va a realizar el mismo día, las muestras se pueden guardar a 2 – 8 °C. Las muestras que se van a analizar posteriormente deben

almacenarse a temperaturas de - 20 °C o inferiores. Evite congelar y descongelar las muestras repetidas veces.

Preparación de los componentes

Dilución de M65 HRP Conjugate

Diluya M65 HRP Conjugate con M65 Conjugate Dilution Buffer. El vial de M65 HRP Conjugate contiene exactamente 0,4 ml. Añada 9,2 ml de M65 Conjugate Dilution Buffer directamente al vial de M65 HRP Conjugate y mézclelos.

Disolución de Wash Tablet

Disolver un comprimido Wash Tablet en 500 ml de agua desionizada fresca.

Almacenamiento y periodo de validez después de abrirlo por primera vez

Si no se usa todo el kit, guarde los reactivos en sus recipientes originales a entre 2 y 8 °C. Si no se usan todas las tiras, vuelva a sellar la bolsa de microtiras. No se olvide de incluir el desecante.

TMB Substrate y M65 HRP Conjugate son sensibles a la luz y a los iones metálicos y deben guardarse en sus frascos de ámbar originales a 2 – 8 °C en todo momento entre un uso y otro. Si se utiliza un nuevo recipiente, tiene que estar protegido de la luz. TMB Sustrate no se puede utilizar después de haber estado expuesto a la luz.

Si el kit se usa en varias ocasiones, guarde M65 HRP Conjugate en el vial a 2 – 8 °C. No exponer a la luz. La solución diluida de M65 HRP Conjugate es estable durante 3 semanas.

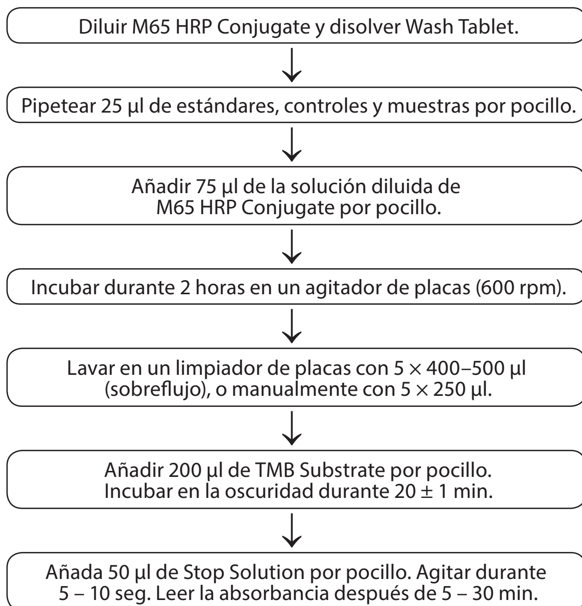
La solución de lavado preparada es estable durante 5 semanas cuando se guarda a 2 – 8 °C.

Procedimiento de análisis

El test M65® ELISA deberá llevarse a cabo a temperatura ambiente (24 ± 3 °C).

1. Saque los reactivos y las muestras con tiempo para que estén a temperatura ambiente cuando sea la hora de realizar el análisis. Antes de usarlos, pase todos los reactivos por el agitador tipo vortex.
2. Disuelva la Wash Tablet en agua desionizada fresca (consulte “Preparación de los componentes”).
3. Diluya M65 HRP Conjugate con M65 Conjugate Dilution Buffer y mézclelos (consulte “Preparación de los componentes”).
4. Pipetee 25 µl por pocillo de M65 Standard (A – G), de M65 Control Low y M65 Control High o de la muestra (se recomienda tener duplicados).
5. Añada 75 µl de la solución diluida de M65 HRP Conjugate en cada pocillo. ***Nota***: *los pasos 4 y 5 se deben hacer secuencialmente sin interrupción en un plazo de 20 minutos.*
6. Cubra los pocillos con cinta para sellar o una tapa de una placa de microvaloración.
7. Incube durante 2 horas en el agitador. Ajuste de velocidad: 600 rpm.
8. Lave la placa en un limpiador de placas cinco veces con 400–500 µl/pocillo (lavado de sobreflujo)
   o
   Lave la placa manualmente, descartando la solución de incubación y lavando los pocillos cinco (5) veces con 250 µl de la solución de lavado preparada diluida. Evite la contaminación entre los pocillos.
9. Añada 200 µl de TMB Substrate a cada pocillo. Incúbelos en la oscuridad a temperatura ambiente durante 20 ± 1 minutos.
10. Añada 50 µl de Stop Solution a cada pocillo. Para garantizar la mezcla completa de TMB Substrate y Stop Solution, agite la microplaca de 5 a 10 segundos. Espere 5 minutos antes de leer la absorbancia.
11. Determine la absorbancia a 450 nm antes de los 30 minutos en un lector de microplacas y anote los resultados.
12. Calcule los resultados como se describe en la Sección “Cálculo de resultados analíticos”.

Flujograma



Cálculo de resultados analíticos

Los resultados de M65® ELISA se calculan usando métodos asistidos por ordenador. Evalúe los valores de los controles y las muestras usando un programa adecuado para la manipulación de datos tipo ELISA. Algoritmo de ajuste: Función Cubic Spline. eje x: concentración (U/l); eje y: absorbancia a 450 nm (A450).

Notas si las muestras se han diluido, la concentración observada deberá multiplicarse por el factor de dilución y si se usó suero/plasma de donantes de sangre, habrá que tomarse en cuenta la concentración de M65 (U/l).

Funcionamiento del análisis

Características del rendimiento

Intervalo de medición: El intervalo de medición es 0 – 2.000 U/l.

Efecto de dosis alta: No se produce un efecto de dosis alta hasta las 50.000 U/l.

Reproducibilidad: La variación intraanalítica (WA % CV) es < 10 % y la variación interanalítica (BA % CV) es < 10 % para muestras > 200 U/l.

Sensibilidad: La concentración mínima detectable de K18 en M65® ELISA es de 11 U/l, definida como la concentración de K18 que corresponde a la absorbancia a dos desviaciones estándar con respecto a la absorbancia del Standard A (0 U/l).

Ensayo de recuperación: El estándar proporcionado con el kit contiene material recombinante que no corresponde a K18 medidos en las muestras de sangre y, por lo tanto, no es adecuado para ensayos de recuperación.

Linealidad/dilución: Recuperación en suero humano cuando se diluye en M65 Standard A (0 U/l): 126 % (promedio) y 116 – 139 % (intervalo). Recuperación en suero humano cuando se diluye en suero de donantes de sangre: 120 % (promedio) y 101 – 133 % (intervalo). Las muestras de suero/plasma > 2.000 U/l se pueden diluir 1 + 1 con el Standard A, pero se recomienda la dilución con suero humano agrupado.

Intervalo de referencia: En suero de 222 donantes de sangre suecos, la mediana fue de 264 U/l y el percentil 95 fue de 413 U/l. Se recomienda que cada laboratorio establezca su propio intervalo de referencia.

Trazabilidad del estándar

Las unidades medidas por M65® ELISA se definen frente a un péptido sintético que contiene los epítopos M6 y M5. 1 U/l = 1,24 pM (ref. 1).

Control de calidad interno

Los controles bajo (Low) y alto (High) suministrados con sus concentraciones dadas son suficientes para garantizar el funcionamiento de los análisis y se recomienda que se empleen por duplicado cada vez que se realice el análisis.

Si este procedimiento no es suficiente, cada laboratorio tiene que establecer sus propios controles según lo previsto en la sección “Obtención y preparación de muestras *in vitro* para el uso en investigaciones

exclusivamente" o las prácticas rutinarias del laboratorio. Los controles se deberán congelar en alícuotas y manipular de la misma forma cada vez que se lleva a cabo el análisis.

Limitaciones del método

No se ha establecido plenamente la utilidad clínica de la medición de K18 como indicador pronóstico ni para el tratamiento de pacientes sometidos a regímenes de terapia.

Las muestras muy lipémicas (≤ 1.250 mg/dl), ictéricas (≤ 12,5 mg/dl) o hemolizadas (≤ 100 mg/dl) no interfieren en el análisis.

Referencias bibliográficas

1. Kramer *et al*., Cancer Res 64, 2004, 1751.
2. Hägg *et al*., Invest New Drugs 20, 2002, 253.
3. Olofsson *et al*., Clin Cancer Res 13, 2007, 3198.
4. Olofsson *et al*., Cancer Biomarkers 5, 2009, 117.
5. Greystoke *et al*., Ann Oncol 19, 2008, 990.
6. Linder *et al*., Expert Rev Mol Diagn 10, 2010, 353.

Para ver otras referencias, consulte www.peviva.com/literature.

Es

Garantía

Los datos de rendimiento presentados aquí fueron obtenidos usando el procedimiento indicado. Cualquier cambio o modificación del procedimiento recomendado por el fabricante podría afectar los resultados. En tal caso, el fabricante renuncia a todas las garantías explícitas, implícitas o reglamentarias; entre otras, las garantías implícitas de comerciabilidad e idoneidad para el uso. El fabricante y sus distribuidores autorizados, en dicho caso, no serán responsables por daños indirectos o consecuentes.

PEVIVA Products

Assays

M30 Apoptosense® ELISA
Prod. No. 10011

M30 CytoDeath™ ELISA
Prod. No. 10900

M65® ELISA
Prod. No. 10020

M65 EpiDeath® ELISA
Prod. No. 10040

Antibodies

M30 CytoDEATH™

– Unconjugated	Prod. No. 10700
– Biotin	Prod. No. 10750
– Fluorescein	Prod. No. 10800
– Orange	Prod. No. 10830

M5 Keratin 18
Prod. No. 10600

M6 Keratin 18
Prod. No. 10650



VLVbio
VIVALAVIDA AB, Hästholmsvägen 32, 131 30 Nacka, Sweden
Phone: +46 8 122 053 00 • www.vlvbio.com • info@vlvbio.com

Date of issue/Datum för utgivning/Ausgabedatum/Date de publication/
Data di publicazione/Fecha de publicación: 2014-12-19

90097